



---

# **MASTERARBEIT**

---

Frau B. Sc.  
**Anne Nöldner**

**Untersuchung der kryoprotektiven  
Wirkung von nicht zytotoxischen  
Substanzen an Geweben**

Mittweida, 2012

# **MASTERARBEIT**

---

## **Untersuchung der kryoprotektiven Wirkung von nicht zytotoxischen Substanzen an Geweben**

Autor:  
**Frau B. Sc.  
Anne Nöldner**

Studiengang:  
**Molekularbiologie/Bioinformatik**

Seminargruppe:  
**MO10w1-M**

Matrikelnummer:  
**19917**

Hochschulbetreuer:  
**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde**  
(Hochschule Mittweida)

Betrieblicher Betreuer:  
**Dr. Gretel Wittenburg**  
(Zellkulturlabor der Klinik und Poliklinik für Mund-,  
Kiefer- und Gesichtschirurgie)

Zeitraum:  
**4. Fachsemester**

## Bibliografische Beschreibung

Nöldner, Anne:

Untersuchung der kryoprotektiven Wirkung von nicht zytotoxischen Substanzen an Geweben. – 2012. – S. 5, S. 67

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Masterarbeit, 2012

## Referat

In der vorliegenden Arbeit wurde die kryoprotektive Wirkung der Kombination aus Dimethylsulfoxid + fetalem Kälber Serum, 1,2-Propandiol + Methylzellulose, 1,2-Ethandiol + Hydroxyethylstärke, Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke und Trehalose + Polyvinylpyrrolidon für *porcine* Hornhäute und *humane* Mundschleimhautkonstrukte untersucht. Des Weiteren erfolgte die Testung der Einzelsubstanzen Polyvinylpyrrolidon und Trehalose. Die Überprüfung der kryokonservierenden Wirkung dieser Medien wurde anhand der Revitalisierung von Hornhäuten und Gewebeäquivalenten nach dem Einfrieren und Auftauen beurteilt. Dazu wurden verschiedene histologische und morphologische Parameter untersucht und ein Proliferationsassay durchgeführt. Unter Verwendung statistischer Analysen ließen sich signifikante Zusammenhänge zum Überleben des *Cornea*-Endothels sowie zur Revitalisierung der Gewebeäquivalente erkennen. Nach gründlicher Prüfung aller Ergebnisse, erwiesen sich einerseits die Kombination aus Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke und andererseits die Substanz Polyvinylpyrrolidon geeignet zu Kryokonservierung beider Gewebe.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Masterarbeit tatkräftig unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern, *Dr. rer. medic. Gretel Wittenburg* und *Dipl. Biol. Carola Petto*, die dieses Thema ins Leben gerufen haben und mit ihrem Fachwissen und anregenden Diskussionen zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben. Die stete Unterstützung auch in stressigen Zeiten führte zum Erfolg dieser Arbeit. Mein Dank gilt weiterhin *Diana Jünger*, die mir mit Rat und Tat bei der experimentellen Durchführung histologischer Methoden beiseite stand.

Außerdem möchte ich mich bei *Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Günter Lauer* bedanken, der mir die Gelegenheit zur Anfertigung dieser Arbeit am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus in Dresden bot. Des Weiteren bedanke ich mich bei *Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde* für die Betreuung von Seiten der Hochschule Mittweida.

Dank auch an *Dr.-Ing. Gert Richter* und *Dr. med. Andreas Güldner*, die mir die Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Analyse und die Entnahme der *Cornea*-Proben ermöglichten.

Für eine angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sorgten *Dr. rer. medic. Gretel Wittenburg*, *Dipl. Biol. Carola Petto*, *Diana Jünger* und *Christin Türke* für die ich mich recht herzlich bedanken möchte. Ich werde die wundervolle Zeit in unseren Laborräumen nie vergessen.

Ein besonderer Dank geht an meine beiden Mädels *Carolin Poch* und *Christin Türke*. Mit ihrer humorvollen Art und Weise haben sie die Zeit meines Studiums zu einem unvergesslichen Erlebnis gemacht. Auch die wunderschönen Stunden mit euch an der „Torfgrube“ Mittweida werden mir mein Leben lang in Erinnerung bleiben. Ich bin froh, dass es euch gibt.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern *Petra* und *Dirk Nöldner* herzlich für die Ermöglichung meines Studiums, die dauerhafte Unterstützung und den liebevollen Rückhalt während der gesamten Zeit bedanken. Auch danke ich *Michael Hengst* für seine Liebe in guten wie in schlechten Zeiten.

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	i
Tabellenverzeichnis .....	ii
Abkürzungsverzeichnis .....	iii
1 Einleitung .....	1
1.1 Motivation .....	1
1.2 Zielstellung .....	3
1.3 Gliederung der Arbeit .....	4
2 Biologische Grundlagen .....	5
2.1 Anatomie des Auges .....	6
2.2 Die <i>Cornea</i> .....	7
2.3 Anatomie der Mundschleimhaut .....	10
2.4 Mundschleimhauttransplantate .....	11
2.5 Kryokonservierung von Gewebe und Zellen .....	13
2.6 Kryoprotektanzen .....	15
3 Material und Methoden .....	17
3.1 Material .....	17
3.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	17
3.1.2 Medien .....	19
3.1.3 Geräte .....	20
3.1.4 Software .....	20
3.2 Methoden .....	21
3.2.1 Präparation und Organkultur der <i>Cornea</i> .....	21
3.2.1.1 Versuchstiere .....	21
3.2.1.2 <i>Bulbi</i> -Entnahme und Präparation der <i>Cornea</i> .....	21
3.2.1.3 Kryokonservierung der <i>Cornea</i> .....	22
3.2.1.4 Auftauen der <i>Cornea</i> .....	22
3.2.1.5 <i>Cornea</i> -Organkultur .....	23

3.2.2 Histologische Methoden für <i>Cornea</i> -Proben .....	23
3.2.2.1 Fixierung und Einbettung in Paraffin .....	24
3.2.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten .....	24
3.2.2.3 Entparaffinierung und Rehydratisierung .....	25
3.2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	25
3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie für <i>Cornea</i> -Proben.....	25
3.2.3.1 Fixierung und Entwässerung der <i>Cornea</i> -Proben .....	26
3.2.3.2 Kritisch-Punkt-Trocknung der <i>Cornea</i> -Proben.....	26
3.2.3.3 Beschichtung der Proben mit Gold .....	28
3.2.3.4 Rasterelektronenmikroskop .....	29
3.2.4 Mundschleimhautkonstrukte .....	31
3.2.4.1 Besiedlung der Mundschleimhautkonstrukte .....	31
3.2.4.3 Kryokonservierung der Mundschleimhautkonstrukte .....	33
3.2.4.4 Auftauen der kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukte .....	33
3.2.4.5 Proliferationsassay .....	33
3.2.5 Analyse und Statistische Tests .....	34
4 Ergebnisse .....	36
4.1 Revitalisierung kryokonservierter Mundschleimhautkonstrukte .....	37
4.2 Untersuchung von uneingefrorenen <i>Corneae</i> als Kontrollgruppe .....	40
4.3 Lichtmikroskopische Epithel- und Endothelbefundung von kryokonservierten <i>Corneae</i> .....	44
4.4 Stromastärkenmessung von kryokonservierten <i>Corneae</i> .....	49
4.5 Rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung von kryokonservierten <i>Corneae</i> .....	51
5 Diskussion .....	54
6 Zusammenfassung .....	65
7 Ausblick .....	67
Literaturverzeichnis .....	68

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Aufbau des menschlichen Auges .....	6
Abbildung 2	Schichtaufbau der <i>Cornea</i> .....	7
Abbildung 3	physikalische Prozesse bei der Kryokonservierung .....	14
Abbildung 4	Phasendiagramm CO <sub>2</sub> .....	27
Abbildung 5	Sputterverfahren .....	29
Abbildung 6	Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops .....	30
Abbildung 7	Schichtaufbau der Konstrukte .....	32
Abbildung 8	metabolische Reaktion im Proliferationsassay .....	34
Abbildung 9	Absorptionswerte von kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukten.....	37
Abbildung 10	Vergleich der besten Revitalisierungsergebnisse mit uneingefrorenen Kontrollkonstrukten .....	38
Abbildung 11	lichtmikroskopische Epithel- und Endothelbefundung von nativ fixierten und kultivierten <i>Corneae</i> .....	41
Abbildung 12	rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung von nativ fixierten und kultivierten <i>Corneae</i> .....	42
Abbildung 13	Vergleich der Stromastärke von uneingefrorenen <i>Corneae</i> .....	43
Abbildung 14	Epithel- und Endothelbefundung von in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten <i>Corneae</i> .....	46
Abbildung 15	Epithel- und Endothelbefundung von in HEZ+HES und PVP kryokonservierten <i>Corneae</i> .....	47
Abbildung 16	Ergebnis der Stromastärkemessung der <i>Cornea</i> -Proben .....	49
Abbildung 17	Endothelbefundung von in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten <i>Corneae</i> .....	52
Abbildung 18	Endothelbefundung von in PVP und HEZ+HES kryokonservierten <i>Corneae</i> ...	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Übersicht der verwendeten Kryoprotektanzen .....	22
Tabelle 2	Kategorien für lichtmikroskopische Epithel- und Endothelbefundung .....	24
Tabelle 3	Kategorien für rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung.....	26
Tabelle 4	Ergebnis der lichtmikroskopischen Endothelbefundung für uneingefrorene <i>Corneae</i> .....	40
Tabelle 5	Ergebnis der rasterelektronenmikroskopischen Endothelbefundung für uneingefrorene <i>Corneae</i> .....	42
Tabelle 6	Ergebnis der lichtmikroskopischen Epithel- und Endothelbefundung.....	44
Tabelle 7	Ergebnis der rasterelektronenmikroskopischen Endothelbefundung.....	51



## Abkürzungsverzeichnis

BM 1:1	Basismedium 1:1
CPD	<i>Critical Point Dryer</i>
DGFG	Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation
DMSO	Dimethylsulfoxid
ED	1,2-Ethandiol
FKS	Fetales Kälber Serum
Friedman RM ANOVA	<i>Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	Hydroxyethylstärke
HEZ	Hydroxyethylzellulose
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
MTS	Tetrazolium-Verbindung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)
MW	Mittelwert
MZ	Methylzellulose
NHEK	<i>Normal Human Epidermal Keratinocytes</i>
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate-buffered-saline</i>
PD	1,2-Propandiol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
OW RM ANOVA	<i>One Way Repeated Measures Analysis of Variance</i>
REM	Rasterelektronenmikroskop
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SFM	<i>Human Endothelial Serum Free Media</i>
TRE	Trehalose

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation

Laut der Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation (DGFG) besteht ein zunehmender Bedarf an Transplantaten, so wurden 2011 mehr als 2.000 Augenhornhäute (*Cornea*) transplantiert [DGFG, 2012 b]. Bezüglich der begrenzten Verfügbarkeit von Spenderhornhäuten, deren aufwendige Lagerung sowie einer Möglichkeit des Transports, bietet die Kryokonservierung eine optimale Methode zur zeitlichen Entkopplung. Eine ähnliche Problematik besteht bei der Deckung von Defekten im Bereich der Mundschleimhaut bei Krebspatienten. Laut einer Schätzung des Robert-Koch-Instituts Berlin erkranken in Deutschland jährlich etwa 11.400 Menschen an einem Krebsleiden in der Mundhöhle [Beckmann, 2011]. Größere, durch Operationen und Bestrahlungstherapie entstandene Defekte im Bereich der Mundschleimhaut, werden im Allgemeinen mit patienteneigenen Haut- oder Schleimhauttransplantaten gedeckt. Bei Mangel an genügend Eigengewebe besteht die Möglichkeit mittels Tissue Engineering autologe Mundschleimhautkonstrukte *in vitro* herzustellen [Lauer & Schimming, 2002]. Hierzu werden Biopsien im Bereich intakter Mundschleimhaut entnommen, enzymatisch aufgespalten, *in vitro* vermehrt und zur Retransplantation auf Kollagenträgern angesiedelt. Diese autologen Gewebeäquivalente werden nach Abschluss der Tumorthherapie mit der intakten Mundschleimhaut des Patienten vernäht. Auch hierbei besteht der Bedarf die Besiedlung der Konstrukte von der Transplantation zeitlich zu entkoppeln, wobei die Kryokonservierung eine geeignete Methode darstellt [Spoerl et al., 2008].

Der Einfrierprozess kann jedoch zelluläre Schäden verursachen und erfordert daher die Zugabe von Kryoprotektanzien zum Einfriermedium. Diese Kryoprotektanzien verringern die intra- sowie extrazelluläre Eiskristallbildung. Sowohl das von Spoerl et al. (2008) als auch das in der Zellkultur standardmäßig genutzte Kryokonservierungsmedium enthält das bei Raumtemperatur zytotoxisch wirkende Dimethylsulfoxid. Aus diesem Grund wurden im Forschungslabor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Dresden, verschiedene nicht zytotoxische Kryokonservierungsmedien für Mundschleimhautkonstrukte entwickelt. Aufgrund ihres mehrschichtigen Aufbaus weist die Hornhaut des Auges eine strukturelle Ähnlichkeit zur Mundschleimhaut auf. Da die Hornhaut verhältnismäßig einfach und standardisiert zu entnehmen ist, bietet sie sich als Gewebe zur Testung dieser Kryoprotektanzien an. Wegen der begrenzten Verfügbarkeit von *humanen* Hornhäuten und aufgrund der hohen Homologie von Mensch und Schwein, wird für die geplanten Untersuchungen deshalb auf *porcine Corneae*

zurückgegriffen. Nach Erforschung der Kryoprotektanzen an *porcinen* Hornhäuten können diese Ergebnisse nicht nur zur optimierten klinischen Anwendung autologer Mundschleimhauttransplantate beitragen sondern auch zur Optimierung der Kryokonservierung *humaner* Spenderhornhäute sowie anderer Gewebe.

## 1.2 Zielstellung

Die Kryokonservierung als Methode zur zeitlichen Entkopplung ist bereits für Suspensionszellen Stand der Technik. Aufgrund der meist komplexen Struktur von Geweben stellt die Gefrierkonservierung dagegen eine große Herausforderung dar und wird nur bedingt angewendet. Daher ist Ziel der Arbeit, die Schutzwirkung der in der Arbeitsgruppe vorselektierten Kryokonservierungsmedien für *in vitro* hergestellte Mundschleimhautkonstrukte und *porcine* Hornhäute zu untersuchen.

Die kryokonservierende Wirkung dieser Medien wird anhand der Revitalisierung von Hornhäuten und Gewebeäquivalenten nach dem Einfrieren und Auftauen beurteilt. Hierzu werden Hornhäute von Schweinen entnommen und präpariert, um sie anschließend der Kryokonservierung bzw. der Gewebekultur zu zuführen. Um den Zustand der *Corneae* vor dem Einfrieren und deren anschließende Revitalisierung einzuschätzen, werden verschiedene histologische und morphologische Parameter untersucht. An Paraffinschnitten wird eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt, um strukturelle Variation der *cornealen* Zellschichten zu beurteilen. Des Weiteren erfolgt eine Befundung der Endothelzellschicht, einem wichtigen klinischen Vitalitäts-Parameter. Parallel dazu werden Gewebeäquivalente der Mundschleimhaut erzeugt. Hierzu werden Kollagenschwämme mit drei für die *orale Mukosa* typischen Zellen besiedelt und *in vitro* kultiviert. Diese Mundschleimhautkonstrukte werden ebenfalls kryokonserviert, aufgetaut und ankultiviert. Zur Beurteilung der Konstrukte wird ein Proliferationsassay durchgeführt.

Die Entwicklung eines standardisierten Kryokonservierungsprotokolls für *porcine* Hornhäute und Mundschleimhautkonstrukte könnte sowohl zur Optimierung der klinischen Applikation als auch zur Weiterentwicklung der Kryokonservierung anderer Gewebe beitragen.

### 1.3 Gliederung der Arbeit

Im *Kapitel 2* werden die biologischen Grundlagen für das Gesamtverständnis dieser Arbeit dargelegt. Dabei wird zuerst die Anatomie des Auges vorgestellt, um anschließend einen Zusammenhang zwischen der Morphologie der *Cornea* und der Mundschleimhaut herzustellen. Des Weiteren erfolgt die Beschreibung des Kryokonservierungsprozesses für Zellen und Gewebe und der Funktionsweise von Kryoprotektanzien. Parallel wird ein Überblick über den aktuellen Stand der Forschung der Kryokonservierung und der Entwicklung von Mundschleimhautkonstrukten gegeben.

In dieser Arbeit werden die verwendeten Materialien und etablierten Methoden im *Kapitel 3* aufgezeigt. Hierbei wird zuerst auf die Präparation, Kryokonservierung und anschließende Kultivierung der Hornhäute eingegangen. Des Weiteren werden die histologischen und morphologischen Analysemethoden für das *Cornea*-Gewebe vorgestellt. Anschließend erfolgt die Beschreibung des Besiedlungs- und Kryokonservierungsprotokolls für Mundschleimhautkonstrukte.

Die Ergebnisse der Kryokonservierungsversuche an *porcinen* Hornhäuten und *in vitro* hergestellten Mundschleimhautkonstrukten werden im *Kapitel 4* detailliert vorgestellt und im *Kapitel 5* diskutiert. Dabei zeigen einerseits die Kombination von Hydroxyethylzellulose und Hydroxyethylstärke als auch die Substanz Polyvinylpyrrolidon gute kryoprotektive Effekte für beide Gewebe. Eine Zusammenfassung über die in dieser Arbeit erzielten Erkenntnisse wird in *Kapitel 6* gegeben.

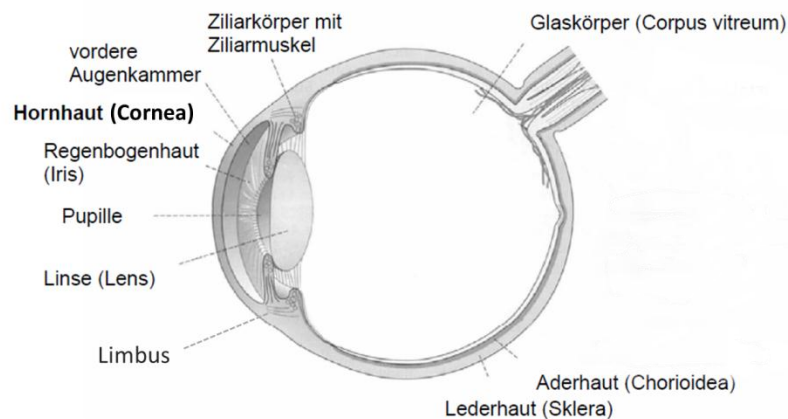
Mit einem Ausblick über weiterführende Experimente und mögliche Erweiterungen des Versuchsaufbaus wird die Arbeit in *Kapitel 7* abgerundet.

## 2 Biologische Grundlagen

Defekte im Bereich der Mundschleimhaut werden im Allgemeinen mit Haut- oder Schleimhauttransplantaten gedeckt. Bei Mangel an genügend Eigengewebe und großen Defekten können mittels Tissue Engineering hergestellte autologe Mundschleimhautkonstrukte transplantiert werden [Lauer & Schimming, 2002]. Dabei besteht der Bedarf die Besiedlung der Konstrukte von der Transplantation zeitlich zu entkoppeln. Eine geeignete Methode stellt die Kryokonservierung der Mundschleimhautkonstrukte dar [Spoerl et al., 2008]. Um die Vitalität der Konstrukte bestmöglich zu erhalten, wurden verschiedene Kryokonservierungsmedien untersucht [Müller, 2012]. Da im klinischen Zusammenhang das Einfrieren von Mundschleimhaut nicht erforderlich ist, sollen die kryoprotektiven Eigenschaften der untersuchten Substanzen auf ein natürliches Gewebe übertragen werden, bei dem ebenfalls die zeitliche Entkopplung durch Kryokonservierung vorteilhaft ist. Unter Betrachtung der Morphologie wurde dazu die Hornhaut des Auges gewählt. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von *humaner Cornea* wird in dieser Arbeit *porcines* Gewebe verwendet. Um einen Einblick in den biologischen Hintergrund zu erhalten, werden im Folgenden die Anatomie des Auges und der *Cornea* beschrieben. Weiterhin wird eine strukturelle Ähnlichkeit der zwei Gewebe durch Erläuterung des Mundschleimhautaufbaus verdeutlicht. Abschließend wird der physikalische Prozess der Kryokonservierung und die dabei entstehenden möglichen Gewebeschäden beschrieben. Unter Beachtung dieser Grundlagen soll das für die Mundschleimhautkonstrukte entwickelte Kryokonservierungsprotokoll auf die *Cornea* übertragen werden.

## 2.1 Anatomie des Auges

Der nahezu runde Augapfel (*Bulbus*) (Abbildung 1) ist ein Hohlorgan, das von einer geleeartigen Substanz, dem Glaskörper (*Corpus vitreum*), und der Linse (*Lens cristallina*) ausgefüllt wird. Dieser wird von der sehr derben und lichtundurchlässigen Lederhaut (*Sclera*) umschlossen. Die Wand des Augapfels ist grundsätzlich aus drei Schichten aufgebaut. Die *Tunica externa bulbi* stellt die äußere Hülle des *Bulbus* dar und wird aus der weißen *Sclera*, dem *Limbus* und der Hornhaut (*Cornea*) gebildet. Darunter befindet sich die *Tunica vasculosa bulbi*, welche sich aus der Aderhaut (*Chorioidea*), Regenbogenhaut (*Iris*) und dem Ziliarkörper (*Corpus ciliare*) zusammensetzt. Die zum Glaskörper zugewandte Schicht, die *Tunica interna bulbi*, wird aus der Netzhaut (*Retina*) gebildet. Der für die Sehfunktion wichtige optische Apparat besteht frontal betrachtet aus der Hornhaut, der vorderen Augenkammer (*Camera anterior bulbi*), der *Iris*, der Linse und dem Glaskörper, wobei *Iris* und Linse die Pupille bilden. Die wichtigste Voraussetzung zum Sehen ist dabei die Transparenz der *Cornea*. Diese wird durch den Aufbau des Gewebes, die Gefäßfreiheit und die Zellarmut ermöglicht. [Goffer, 2005; Götze, 2011; Grehn, 2008; Komai & Ushikif, 1991; Schiller, 1998]

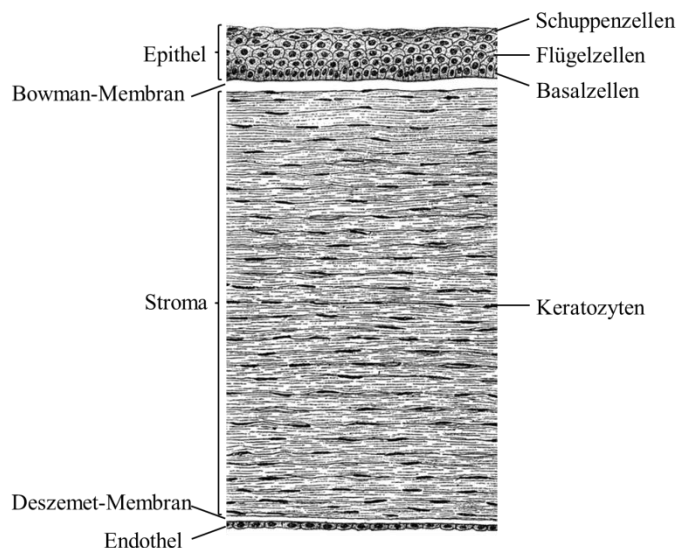


**Abbildung 1** Aufbau des menschlichen Auges

Die äußere Hülle des menschlichen Auges besteht aus drei Schichten. Die *Tunica externa bulbi* setzt sich dabei aus der Lederhaut, dem *Limbus* und der Hornhaut zusammen. Darunter befindet sich die *Tunica vasculosa bulbi*, welche aus Aderhaut, Regenbogenhaut und Ziliarkörper gebildet wird. Die *Tunica interna bulbi* stellt die innerste Schicht dar und besteht aus der Netzhaut. Im Augeninnenkörper befinden sich die vordere und hintere Augenkammer, die Pupille, die Linse und der Glaskörper. [modifiziert nach Seeber, 2008]

## 2.2 Die Cornea

Die *Cornea* ist Teil der *Tunica externa bulbi* und liegt im vorderen Augenabschnitt des *Bulbus*. Sie ist eine durchsichtige, konvex-konkave, elliptische Linse und das wichtigste lichtbrechende Element im Auge. Mit einer Stärke von 0,52 mm ist die *humane Cornea* zentral dünner als an der Peripherie (0,67 mm) [Barraquer & Rutllan, 1991]. Anatomisch trennt die Hornhaut die vordere Augenkammer von der Außenwelt und ist durch den *Limbus* von der *Sclera* abgegrenzt. Für das Augeninnere übt sie eine Barriere- und Schutzfunktion aus. Die *Cornea* setzt sich histologisch aus fünf Schichten zusammen: dem Epithel, der Bowman-Membran, dem Stroma, der Deszemet-Membran und dem Endothel (Abbildung 2) [Müller, 2005]. Infolge der Gefäßfreiheit und der Zellarmut der *Cornea*-Schichten entsteht die Transparenz der Hornhaut [Rohen, 1996]. Ihre hohe Lichtdurchlässigkeit ermöglicht den Sehvorgang und bildet zusammen mit der Linse den wichtigsten Teil des optischen Apparats. [Götze, 2011; Kiely et al., 1982; Seeber, 2008]



**Abbildung 2** Schichtaufbau der *Cornea*

Die *Cornea* ist eine konvex-konkave Linse und lässt sich histologisch in fünf Schichten unterteilen. Die Oberfläche der *Cornea* besteht aus mehrschichtigem Plattenepithel. Die im Epithel vorkommenden Zellen lassen sich in drei Zelltypen unterteilen: die Schuppenzellen, die Flügelzellen und die Basalzellen. Unter der Epithelzellschicht liegen die Bowman-Membran und das Stroma. Die folgende Schicht ist die Deszemet-Membran, wobei es sich vermutlich um ein Ausscheidungsprodukt der darauf liegenden Endothelzellschicht handelt. [modifiziert nach Piersol, 1908]

### Das Epithel

Die äußerste Schicht der *Cornea* wird aus einem fünf- bis sechsschichtigen, unverhornten Plattenepithel gebildet. Mit einer Stärke von etwa 50 µm entspricht es 10 % der Gesamtdicke der Hornhaut. Die Epithelzellen lassen sich je nach Differenzierungsgrad in drei Zelltypen



unterteilen: Schuppen-, Flügel- und Basalzellen [Nishida, 1997]. Die ausdifferenzierten Schuppenzellen sind extrem lang und flach und liegen in zwei bis vier Schichten oben auf. Sie sind durch tight junctions [Müller, 2005] miteinander verbunden und werden nach Absterben über den Tränenfilm abtransportiert. Die zwei- bis dreischichtigen Flügelzellen bilden im Differenzierungsprozess das Zwischenstadium und sind durch ihre dünnen stachelartigen Fortsätze gekennzeichnet. Basalzellen bilden die unterste einschichtige Zellebene des Epithels und sind durch ihre säulenartige Form sowie senkrecht stehende Zellkerne charakterisiert. Sie besitzen als einzige der drei Zelltypen eine mitotische Aktivität und die Fähigkeit zur Differenzierung, wodurch aus ihnen Flügel- und Schuppenzellen entstehen können. Neue Epithelzellen bilden sich im *Limbus* und migrieren zur Mitte der *Cornea*. Zwischen der Epithelzellschicht und der Bowman-Membran befindet sich die ca. 50 nm dicke Basalmembran. Diese Membran wird von den Basalzellen gebildet und besteht aus Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV. Sie dient der Erhaltung des Epithels und dessen Adhäsion am Stroma [Nishida, 1997]. [Götze, 2011; Seeber, 2008]

### **Die Bowman-Membran**

Die Bowman-Membran ist eine widerstandsfähige, unelastische, 8 – 14 µm dicke Schicht unterhalb des Epithels und verleiht der *Cornea* ihre Plastizität. Sie verbindet die Basalmembran mit dem Stroma und besteht aus Kollagenfibrillen Typ I und III und Proteoglykanen. Dieser Aufbau dient wahrscheinlich der Strukturhaltung des Epithels. [Götze, 2011; Seeber, 2008]

### **Das Stroma**

Die mittlere Schicht der *Cornea* bildet das Stroma und nimmt mit einer Stärke von 400 – 500 µm ca. 90 % der gesamt Hornhautdicke ein. Das Stroma ist hydrophil, zellarm und gefäßfrei [Müller, 2005]. Im Einzelnen besteht das Stroma aus 75 % Wasser, extrazellulärer Matrix, spindelförmigen Hornhautfibrozyten (Keratozyten) und Lamellen mit Kollagenfibrillen. Die Keratozyten bilden die extrazelluläre Matrix und liegen darin eingebettet. Hauptbestandteile dieser Matrix sind Kollagenfasern Typ I und III, Proteoglykan und Glykosaminoglykan. Die im Stroma liegenden Kollagenlamellen bilden eine regelmäßige Gitterstruktur und sorgen für eine besonders hohe Stabilität sowie für die Transparenz der *Cornea*. Glykosaminoglykane dienen der Wasserbindung im Stroma, lassen jedoch bei übermäßiger Wassereinlagerung das Stroma aufquellen und die Hornhaut trüb erscheinen. Infolge der Gefäßfreiheit führen Verletzungen zur Vernarbung des Gewebes. [Götze, 2011; Seeber, 2008]

### **Die Deszemet-Membran**

Die Deszemet-Membran ist eine durchsichtige, hoch elastische und widerstandsfähige Membran der *Cornea*. Während des Lebenszyklus verdickt sie sich von 3 – 4 µm auf 10 – 12 µm. Sie

besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ IV und Laminin wobei es sich wahrscheinlich um ein Ausscheidungsprodukt der Endothelzellschicht handelt. Die Hauptaufgabe der Deszemet-Membran ist der Schutz des Endothels gegen Infektionen und mechanische Verletzungen. [Götze, 2011; Seeber, 2008]

### **Das Endothel**

Das einzelschichtige Endothel bildet die unterste Zelllage der *Cornea* und die Angrenzungsfläche zur vorderen Augenkammer. Es handelt sich bei diesem Zelltyp um Epithelzellen, die einzig aufgrund ihrer innenliegenden Lokalisation als Endothel bezeichnet werden, nicht jedoch mit Blutgefäßzellen verwechselt werden dürfen. *Corneale* Endothelzellen haben eine regelmäßige hexagonale Form und sind von ähnlicher Größe. Sie sind untereinander durch gap und tight junctions verbunden und durch große Zellkerne charakterisiert. Diese Zellen sind reich an zytoplasmatischen Organellen und haben einen sehr aktiven Stoffwechsel. Das Endothel der *Cornea* gehört zum postmitotischen Zelltyp, das heißt es ist nur bedingt teilungsfähig. Beim Absterben der Zellen werden die entstehenden Lücken durch Zellvergrößerungen (Polymorphismus und Polymegatismus) ersetzt. Dies führt zum Verlust der regelmäßigen sechseckigen Gestalt der Zellen und zur Bildung von Riesenzellen. Für die Aufrechterhaltung der Transparenz der *humanen Cornea* ist eine Endothelzelldichte von mindestens 300 - 800 Zellen/mm<sup>2</sup> nötig [Seeber, 2008]. Zu Beginn des Lebens verfügt die Hornhaut über eine Endothelzelldichte von 3500 Zellen/mm<sup>2</sup>, welche jährlich um ca. 0,5 % abnimmt [Waring et al., 1982]. Die Aufgaben des Endothels umfassen die Kontrolle der Diffusion von Stoffwechselprodukten aus der vorderen Augenkammer, die Synthese von Komponenten für die Deszemet-Membran und die Entquellung des Stromas. Der Hydratationszustand des Stromas und damit die Transparenz der *Cornea* werden durch die Pumpleistung der Endothelzellen gewährleistet [Diecke et al., 2004]. Damit hängt die gesamte Funktionalität der *Cornea* entscheidend von der Vitalität und strukturellen Integrität der Endothelzellschicht ab. [Seeber, 2008] Diese Schicht wird daher auch als vitalitätsbestimmender Parameter für *porcine Corneae* in der vorliegenden Arbeit untersucht.

## 2.3 Anatomie der Mundschleimhaut

Eine mit der *Cornea* vergleichbare mehrschichtige Gewebekonfiguration findet sich in der Mundschleimhaut. Diese Mundhöhlenschleimhaut setzt sich grundsätzlich aus einem mehrschichtigen unverhornten Plattenepithel (*Mukosa*), einer Basalmembran, bindegewebigem Stroma (*Lamina propria*) und der darunter liegenden *Submukosa* zusammen [Bork et al., 2008]. Der Aufbau der *Mukosa* ähnelt dem der äußeren Haut und besteht aus einer Basalzellschicht, der Stachelzellschicht, der Körnerschicht, der Hornschicht und einer dazwischenliegenden transparenten Schicht [Moharamzadeh et al., 2007]. Die *Lamina propria* ist eine dünne Schicht aus kollagenen Bindegewebsfasern, in der Fibrozyten, Lymph- und Blutgefäße, Rezeptoren und Nervenfasern eingebettet sind. Die sich darunter befindende *Submukosa* enthält ein Gefäß- und Nervennetzwerk und besteht aus lockerem Bindegewebe. Infolge funktioneller und daraus resultierenden strukturellen Abweichungen der Schleimhaut können anhand der Lokalisation in der Mundhöhle drei Mundschleimhauttypen unterschieden werden. Die mastikatorische Schleimhaut ist fest haftend, nicht verschiebbar, besteht aus verhorntem Epithel und kommt am Zahnfleisch (*Gingiva*) und hartem Gaumen vor. Die leicht verschiebbare auskleidende Schleimhaut befindet sich an Lippen, Wangen, Mundboden und weichem Gaumen, wobei das Epithel unverhornt bleibt. Der Zungenrücken ist mit spezialisierter Schleimhaut bedeckt, in der sich Papillen für Geschmacks- und Temperaturwahrnehmungen befinden. [Bork et al., 2008; Lüllmann-Rauch, 2009; Schwenzer & Ehrenfeld, 2000]

## 2.4 Mundschleimhauttransplantate

Zur Deckung großer Mundschleimhautdefekte ist die Verwendung von körpereigener Mundschleimhaut aufgrund der starken strukturellen Abweichung und der begrenzten Verfügbarkeit klinisch nicht durchführbar. Demzufolge werden Mundschleimhautbiopsien von entsprechenden Patienten im Tissue Engineering angezüchtet. Tissue Engineering geht auf Techniken der Embryologie zurück und kombiniert Gewebe- und Zellkultur mit Verfahren der Materialwissenschaften [Langer & Vacanti, 1993; Roux, 1885]. Die Entwicklung von autologen Mundschleimhauttransplantaten mittels Tissue Engineering und deren Anwendung stellen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie eine Möglichkeit für regenerative Therapien dar. Zahnverlust oder die Resektion von Tumoren kann zum Schwund von Weichgewebe führen. Um die Funktionalität der Mundhöhle (Kau- und Sprechfunktion) wiederherzustellen, werden entsprechende Transplantationen vorgenommen. Weitere Anwendungen finden Schleimhauttransplantate in der Verbrennungschirurgie, bei schlecht heilenden Wunden sowie bei plastischen Rekonstruktionen. [Härle, 1989; Tallgren, 1972]

Zu Beginn wurden für die Deckung von großen Mundschleimhautdefekten Spalthauttransplantate genutzt [Schuchardt, 1952]. Spaltmundschleimhauttransplantate schützen aufgrund der Epithel- und *Submukosa*-Komponenten gegen Bakterienkontamination und chemische Substanzen. Jedoch stellen Haarwachstum, Hyperproliferation und übermäßige Verhornung der Haut große Nachteile dar [Mitchell et al., 1990]. Alternativ dazu werden heute mittels Tissue Engineering autologe Transplantate hergestellt. [Sauerbier et al., 2006]

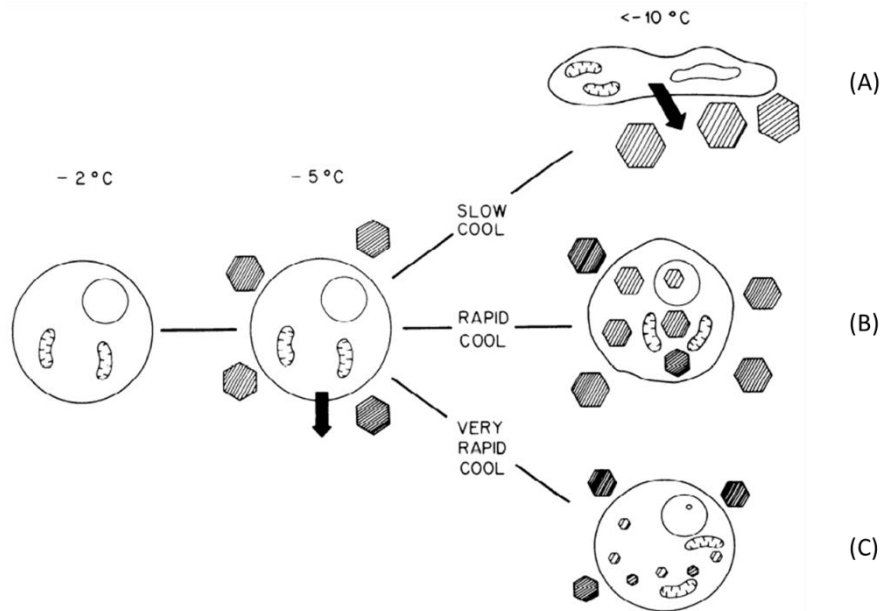
Für die Evaluierung optimaler Voraussetzungen wurden im Laufe der Jahre verschiedene Biomaterialien, Zellen und Kulturmedien getestet [Moharamzadeh et al., 2007]. Diese Fortschritte im Tissue Engineering erlauben die dreidimensionale Rekonstruktion *humaner* Mundschleimhaut. Der große Vorteil autologer Transplantate liegt im reduzierten Risiko einer Immunreaktion, wobei die Gefahr einer Abstoßungsreaktion verringert wird [Moharamzadeh et al., 2012]. Dies ist in der Tatsache begründet, dass Spender und Empfänger äquivalent sind.

Die Herstellung autologer Mundschleimhauttransplantate erfolgt für jeden Patienten individuell [Spoerl et al., 2008]. Hierfür wird im Allgemeinen drei bis vier Wochen vor der Transplantation eine Biopsie der gesunden Mundschleimhaut und Blut vom Patienten entnommen. Anschließend wird die Biopsie zerkleinert und in Zellkulturflaschen kultiviert, wobei dem Kulturmedium autologes Blutserum hinzugefügt wird. Nach zwei bis drei Wochen wird der entstandene Zellrasen abgelöst und als Sekundärkultur auf ein Transplantat-Gerüst, dem sogenannten Scaffold, ausgesät. Innerhalb der nächsten Woche entstehen zwei- bis dreischichtige Zellverbände auf dem Scaffold. Während der gesamten Prozedur ist darauf zu

achten, dass die gewonnenen Zellen hoch proliferativ und nicht ausdifferenziert sind. Abschließend erfolgt die Transplantation der tissue-engineerten Mundschleimhaut in den Patienten. [Lauer & Schimming, 2002; Spoerl et al., 2008]

## 2.5 Kryokonservierung von Gewebe und Zellen

Damit der Prozess der Transplantation zeitlich entkoppelt werden kann, werden die im Tissue Engineering hergestellten Gewebeäquivalente eingefroren. In der Zellkultur ist das Einfrieren von Suspensionszellen Stand der Technik, wohingegen die Kryokonservierung von Gewebe derzeit noch eine große Herausforderung darstellt [Brockbank, 2002]. Unter Kryokonservierung (*griech.: kryos = Kälte, lat.: conservare = erhalten*) wird eine Methode zur Langzeitlagerung von Geweben und Zellen unter Wahrung ihrer Vitalität und Hemmung aller metabolischen Reaktionen verstanden [Richter, 2003; Özkavukcu & Erdemli, 2002]. Eine optimale Kryokonservierung erhält die ursprüngliche Zellstruktur und Gewebekomponenten [Bakhach, 2009]. Flüssiges Wasser ist jedoch eine Voraussetzung für Erhaltung von Struktur und Funktion lebender Zellen. Infolge dessen ist es nicht verwunderlich, dass die Eisbildung in der Regel tödlich ist [Mazur, 1984]. Die Schwierigkeit bei der Kryokonservierung von Gewebe liegt vor allem in ihrer hoch organisierten, oft komplexen Struktur, die ihre Reaktion auf Einfrieren und Auftauen beeinflusst und das Durchdringen von protektiven Substanzen erschwert [Brockbank, 2002]. Besonders Faktoren wie Geschwindigkeit der Kühlung, die Kühlrate (K/min; °C/min) und die Zusammensetzung des Mediums spielen eine große Rolle bei der Kryokonservierung von Zellen und Geweben [Potrykus & Suhr, 2011]. Die Kryokonservierung kann auf verschiedenen Wegen durchgeführt werden, welche physikalisch von der Abkühlgeschwindigkeit abhängt. Beim langsamen Abkühlen (Abbildung 3, A) kann die Zelle durch Osmose ausreichend Wasser abtransportieren, die intrazellulär gelösten Stoffe anreichern und ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Wasser einstellen. Diesbezüglich kommt es zur Dehydration und Schrumpfung der Zelle, jedoch bleibt eine intrazelluläre Eiskristallbildung aus [Özkavukcu & Erdemli, 2002]. Wird die Zelle schnell oder sehr schnell abgekühlt (Abbildung 3, B und C), kann die Zelle kein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Wasser aufbauen und es kommt zur intrazellulären Kristallisierung. Die Eiskristalle können zum Tod der Zelle führen und sollten daher für das Überleben der Zellen vermieden werden [Mazur, 1984]. Im Allgemeinen wird angenommen, dass intrazelluläres Eis letaler gegenüber extrazellulärem Eis auf Suspensionszellen wirkt [Pegg, 2007]. Jedoch ist bekannt, dass insbesondere die Bildung von extrazellulärem Eis eine Gefahr für strukturierte Gewebe und Organe darstellt [Brockbank, 2002].



**Abbildung 3** physikalische Prozesse bei der Kryokonservierung

Kryokonservierung ist eine Methode zur Lagerung von Geweben und Zellen unter Wahrung ihrer Vitalität. Je nach Abkühlgeschwindigkeit lassen sich drei Kryokonservierungsmethoden unterscheiden. Beim langsamen Abkühlen (A) kann die Zelle ein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Wasser einstellen. Dabei kommt es zur Dehydratation der Zelle, und eine intrazelluläre Eiskristallbildung bleibt aus. Beim schnellen bzw. sehr schnellen Abkühlen (B und C) kann die Zelle kein Gleichgewicht zwischen intra- und extrazellulärem Wasser aufbauen und es kommt zur intrazellulären Kristallisation. Diese Reaktion führt zum Absterben der Zelle und sollte daher vermieden werden. [Mazur, 1977]

Jedoch können auch beim langsamen Abkühlen der Zellsuspensionen Schäden an den Zellen hervorgerufen werden. Allgemein werden verschiedene Theorien über das Entstehen von Zellschäden verfolgt. Zum einen durchbohren intrazellulär gebildete Eiskristalle die Zellwände und trennen die Zellen auf, zum anderen kommt es zur Zerstörung der Zelle durch direkte mechanische Einwirkung von außen. Weiterhin wird vermutet, dass sekundäre Einwirkungen, wie osmotische Veränderungen der Zusammensetzung der flüssigen Phase zu Zellschäden führen [Pegg, 2007]. Zur Verhinderung solcher Schäden am Gewebe werden dem Einfriermedium Kryoprotektanzien hinzugefügt.

## 2.6 Kryoprotektanzen

Eine erfolgreiche Kryokonservierung hängt stark vom Zellvolumen, Wassergehalt und Anteil an osmotisch wirksamen Salzen, Proteinen und anderen gelösten Stoffen ab. Auch reagieren verschiedene Zelltypen auf ein gegebenes Kryoprotektanz unterschiedlich sensibel. Einige Substanzen die für Fibrozyten eine gute Schutzwirkung und Revitalisierung ermöglichen, können auf andere, sensiblere Zellen toxisch wirken [Müller, 2012]. Unter anderem liegt hierfür die Ursache im Fehlen einer Standardprozedur für das Einfrieren von Geweben, die meist aus verschiedenen Zellarten bestehen. Daher ist es unerlässlich neben den kryoprotektiven Effekten, auch die potentiell toxische Wirkung von in Frage kommenden Substanzen zu untersuchen [Fahy, 1986]. Im Allgemeinen erhöhen Kryoprotektanzen die Gesamtkonzentration aller gelösten Stoffe im System und verringern die gebildete Menge an Eis. Dafür müssen diese Additive biologisch verträglich sein und in die Zellen eindringen können [Pegg, 2007]. Von einem theoretischen Standpunkt aus betrachtet, sollten diese Protektanzen in der Lage sein alle beschriebenen Arten von Frostschäden vollständig zu unterdrücken. Jedoch gewährleisteten diese Additive in der Regel keine 100 %ige Überlebensrate nach dem Einfrieren und Auftauen [Fahy, 1986].

Kryoprotektanzen lassen sich in penetrierende und nicht penetrierende Gefrierschutzmittel unterteilen. Penetrierende Additive, wie Dimethylsulfoxid (DMSO) können aufgrund ihres geringen Molekulargewichts und amphiphiler Eigenschaften die Doppellipidschicht durchdringen. Ihre Funktionalität beruht wahrscheinlich auf der Hygroskopie – Bindung von Wasser – und daraus resultierender Hemmung der Eiskristallbildung. Durch Hinzufügen von osmotisch wirksamen Stoffen, wie Fetales Kälber Serum (FKS) wird der osmotische Gradient verringert und die Dehydratation der Zelle verhindert. Aufgrund dieser Eigenschaften wird das Medium DMSO+FKS in der Kryobiologie standardmäßig zur Konservierung von Zellen verwendet [Toyosawa, 2007]. Nicht penetrierende Kryoprotektiva entfalten ihre Schutzwirkung im Extrazellularraum, erhöhen die Viskosität der Kryokonservierungsmedien und reduzieren die Geschwindigkeit der Eiskristallbildung.

Bezüglich der bekannten biologischen und physikochemischen Wirkungen von Kryoprotektanzen wird vermutet, dass die Toxizität dieser Mittel ein wichtiger limitierender Faktor in der Kryobiologie ist. Beispielsweise wird aufgrund der Toxizität von Kryoprotektanzen die Konzentration des Additivs im Medium und somit die kryoprotektive Wirkung begrenzt [Fahy, 1986; Potrykus & Suhr, 2011]. Obwohl DMSO [Lovelock & Bishop, 1959] als sehr effektives Kryoprotektanz eingeschätzt wird, wirkt es in hohen Konzentrationen, vor allem aber bei Raumtemperatur schon in niedrigen Konzentrationen toxisch [Potrykus & Suhr, 2011]. Auch



der Einsatz von FKS birgt Risiken, da die Übertragung von Krankheiten wie der *bovinen spongiformen Enzephalopathie* (BSE) und anderen Infektionen, Anlass zu ernster Besorgnis gibt [Toyosawa, 2007]. Aus diesem Grund werden in dieser Arbeit andere penetrierende sowie nicht penetrierende Kryoprotektiva untersucht und auf den Einsatz von tierischem Serum wird verzichtet.

Alternativen bieten penetrierende Kryoprotektiva wie Alkohole (1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol) und nicht penetrierende Kryoprotektanzen, wie beispielsweise Zucker und verschiedene Polymere [Armitage, 2009; Pegg, 2007; Potrykus & Suhr, 2011]. Die Untersuchung von 1,2-Propandiol und 1,2-Ethandiol als Kryoadditiv basiert auf ihrem Einsatz in Augensalben und -tropfen. Dort bewirken sie die Durchlässigkeit des Gewebes und somit das Eindringen der Wirkstoffe. Ein natürlich vorkommendes Kryoprotektivum ist Trehalose. Dieser Zucker stabilisiert die Membran und wird von einer Vielzahl von Organismen (Bärtierchen [Schill, 2010]), Bakterien und Pflanzen zum Überleben von Einfrieren und Eintrocknen genutzt [Eroglu et al., 2009; Kang & Shen, 2012; Rudolph & Crowe, 1985]. Auch konnte mehrfach gezeigt werden, dass die externe Zugabe von Trehalose positiv mit der Überlebensrate nach den Einfrieren korrelieren [Zhang et al., 2003; Limaye & Kale, 2001; Kim et al., 2001]. Weiterhin wird Polymeren eine kryoprotektive Wirkung zugeschrieben. Beispiele für erfolgreich eingesetzte Verbindungen sind dabei Hydroxyethylzellulose, Hydroxyethylstärke, Methylzellulose und Polyvinylpyrrolidon. Diese komplexen Polymere beeinflussen dabei die Viskosität der Lösung durch Absorption der Wassermoleküle und verhindern intrazelluläre Eiskristallbildung und osmotischen Stress [Madden et al., 1993; Stolzing et al., 2012]. Ihre gleichzeitigen hydrophilen und hydrophoben Eigenschaften und ihre geringe Toxizität sind dabei von Vorteil [Standfast & Jorgensen, 1997].

Bevor ich mit der Darstellung der Ergebnisse fortfahre, möchte ich im folgenden Kapitel die verwendeten Materialien und Methoden darstellen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Name	Artikel-Nr.	Firma
<b>1,2-Ethandiol</b>	9516.1	Carl Roth GmbH
<b>1,2-Propandiol</b>	13,436-8	Sigma-Aldrich
<b>100 % Ethanol</b>	2642M	Berkel AHK
<b>96,4 % Ethanol</b>	1641M	Berkel AHK
<b>80 % Ethanol</b>	7505F	Berkel AHK
<b>Amphotericin B</b>	P11-001	PAA
<b>Betaisodona</b>	923204	Mundipharma GmbH
<b>CASYton</b>		Roche
<b>Cell Proliferation Assay</b>	CellTiter 96® AQueous One Solution	Promega
<b>CollaPlug</b>	Lot. 1115054	Zimmer Dental
<b>Deckgläschen (24 x 60 mm)</b>	02460A	Süsse Labortechnik
<b>Dextran 500</b>	9219.1	Carl Roth GmbH
<b>Dimethylsulfoxid</b>	D2650	Sigma-Aldrich
<b>DMEM High Glucose (4,5 g/l)</b>	E15-883	PAA
<b>Dulbecco's PBS (1 x)</b>	H15-002	PAA
<b>Endothelial Cell Growth Medium</b>	C-22010	PromoCell
<b>Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix</b>	C-39215	PromoCell
<b>Eosin Y</b>	241-409-6	Sigma
<b>Fetal Bovine Serum Gold</b>	A15-151	PAA
<b>Fluoromount-G</b>	0100-01	SouthernBiotech
<b>Formaldehydlösung</b>	N-29401	SAV Liquid Production
<b>Gentamicin</b>	15750	Invitrogen
<b>Glutaraldehyd 70 %</b>	G7776	Sigma-Aldrich
<b>HEPES Buffer Solution (1 M)</b>	S11-001	PAA
<b>Human Endothelial Serum Free Medium</b>	11111	Gibco
<b>Human Umbilical Vein Endothelial Cells, single donor</b>	C-12200	PromoCell

### 3 Material und Methoden

<b>Hydroxyethylstärke</b>	130/0.42	Serumwerke Bernburg Ag
<b>Hydroxyethylzellulose</b>	30,863-3	Sigma-Aldrich
<b>Keratinocyte Basal Medium 2</b>	C-20211	PromoCell
<b>Keratinocyte Basal Medium 2 SupplementPack</b>	C-39011	PromoCell
<b>Leit-C-Plast</b>	G3302	Plano
<b>Mayers Hämalalaun</b>	109249	Merck
<b>MEM Alpha Modification</b>	E15-862	PAA
<b>Methylzellulose</b>	M0262-100G	Sigma-Aldrich
<b>Normal Human Epidermal Keratinocytes, single donor</b>	C-12003	PromoCell
<b>Penicillin/Streptomycin (100 x)</b>	P11-010	PAA
<b>Polyvinylpyrrolidon</b>	PVP40-100G	Sigma-Aldrich
<b>Rh Fibroblast Growth Factor basic</b>	PHG0026	Gibco
<b>Roti®-Histokitt</b>	6638.2	Carl Roth GmbH
<b>Saccharose</b>	107687	Merck
<b>Silberleitlack</b>	G 3303 A	Plano
<b>SP-DiOC18</b>	D-7778	Invitrogen
<b>Stiftprobenteller</b>	G301	Plano
<b>SuperFrost® Plus Objektträger</b>	03-0060	Langenbrinck Labor & Medizintechnik
<b>Trehalose</b>	5151.2	Carl Roth GmbH
<b>Trypsin-EDTA (0,05 %)</b>	25300	Gibco
<b>Xylol</b>	28973.363	VWR

## 3.1.2 Medien

Bezeichnung	Zusatz	Konzentration
<b>Cornea Medium</b>	Human Endothelial Serum Free Medium	
	Rh Fibroblast Growth Factor basic	10 ng/ml
	Hydroxyethylstärke	7,5 %
	Gentamicin	50 µg/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 U/ml
<b>Fibroblasten-Medium</b>	DMEM High Glucose (4,5g/l)	
	Fetal Bovine Serum Gold	10 %
	HEPES Buffer Solution (1M)	2 %
	Gentamicin	50 µg/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 U/ml
<b>Keratinocyten-Medium</b>	Keratinocyte Basal Medium 2 <sup>1</sup>	97,9 %
	Gentamicin	50 µg/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 U/ml
<b>Endothelzellen-Medium</b>	Endothelial Cell Growth Medium <sup>2</sup>	
	Gentamicin	50 µg/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml
	Penicillin	100 U/ml
	Streptomycin	100 U/ml
<b>Basismedium 1:1</b>	Keratinocyten-Medium	50 %
	Endothelzellen-Medium	50 %
<b>Trypsin-Stopp</b>	PBS	
	Fetal Bovine Serum Gold	10 %
	HEPES Buffer Solution (1M)	2 %
	Gentamicin	50 µg/ml
	Amphotericin B	2,5 µg/ml

<sup>1</sup> mit Keratinocyte Basal Medium 2 SupplementPack auf 500 ml versetzt<sup>2</sup> mit Endothelial Cell Growth Medium SupplementMix auf 500 ml versetzt

**3.1.3 Geräte**

<b>Name</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Firma</b>
<b>Autom. Gewebeeinfiltration</b>	TP 1020	Leica
<b>Brutschrank</b>	HeraCell®	Heraeus instruments®
<b>Cell Counter &amp; Analyser System</b>	CASY ® Model TT Version 2.1 D	Schärfe System
<b>Einfrierhilfe</b>	Nalgene® Mr. Frosty	Sigma-Aldrich
<b>Kritisch-Punkt-Trockner</b>	CPD 030	Balzers Union AG
<b>Lichtmikroskop</b>	BX61	Olympus
<b>Paraffinausgießstation</b>	EG 1150 H	Leica
<b>Plate Reader</b>	Anthos Reader 2010 Typ: 1755011	Anthos Mikrosysteme GmbH
<b>Rasterelektronenmikroskop</b>	XL-30 ESEM	Philips
<b>Rotationsmikrotom</b>	Microm HM 355S	Thermo Scientific
<b>Sicherheitswerkbank</b>	51424/5	Astec Microflow
<b>Sputter Coater</b>	S150B	Edwards
<b>Zentrifuge</b>	Megafuge 1.0R	Heraeus instruments®

**3.1.4 Software**

<b>Software</b>	<b>Version</b>	<b>Firma</b>
<b>ADAP</b>	Version 1.6	Anthos Mikrosysteme GmbH
<b>Cell Counter &amp; Analyser System</b>	Version 2.1 D	Schärfe System
<b>Cell F</b>	Version 2.7 Build 1224	Soft Imaging System GmbH
<b>SigmaPlot</b>	Version 12.0 Build 12.0.0.182	Systat Software GmbH
<b>XL Microscop Control</b>		Philips

## 3.2 Methoden

In diesem Kapitel werden alle für *Cornea*-Proben und Mundschleimhautkonstrukte verwendeten Methoden näher erläutert. Die *Cornea* wurde aus *Bulbi* von Versuchstieren gewonnen, kultiviert, kryokonserviert und mittels Licht- und Rasterelektronenmikroskopie begutachtet. Die Mundschleimhautkonstrukte wurden durch Besiedlung von Kollagenträgern mit Gingiva-fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen hergestellt. Anschließend folgte Kultivierung, Kryokonservierung, Auftauen und Rekultivierung. Um die Schutzwirkung der Kryokonservierungsmedien für Mundschleimhautkonstrukte zu beurteilen, wurden Proliferationsassays durchgeführt.

### 3.2.1 Präparation und Organkultur der *Cornea*

Bevor der Kryokonservierungsprozess an den Hornhäuten untersucht werden konnte, mussten diese aus *Bulbi* von Versuchstieren entnommen und präpariert werden. Nach Einfrieren der *Corneae* in den Kryokonservierungsmedien wurden diese bei  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  für mindesten eine Woche gelagert. Nach dem Auftauen wurden die *Corneae* für drei Tage kultiviert. Anschließend konnten die histologischen und rasterelektronenmikroskopischen Methoden zur Evaluierung der Kryokonservierung der *Corneae* durchgeführt werden.

#### 3.2.1.1 Versuchstiere

Für die Präparation der *Corneae* wurden in allen Versuchen ca. 12 Wochen alte weibliche deutsche Landrasse Schweine verwendet. Die Tötung der Tiere erfolgte durch eine Trapanal/KCL-Lösung (entsprechend der Angaben im Tierversuchsantrag).

#### 3.2.1.2 *Bulbi*-Entnahme und Präparation der *Cornea*

Die *Bulbi* wurden etwa zehn Minuten nach Tötung der Versuchstiere entnommen. Nach der Entnahme wurde der *Bulbus* zum Transport in eine mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gefüllte, feuchte Kammer überführt. Anschließend wurde der *Bulbus* in PBS, für vier Minuten in Betaisodona und erneut zweimal in PBS gespült. Danach wurde der *Bulbus* in eine selbstgefertigte Halterung gelegt und das Bindegewebe um die *Cornea* mit dem Skalpell entfernt. Im nächsten Schritt wurde die *Sclera* mit dem Skalpell punktiert und die *Cornea* mit einer Schere zirkulär umschnitten, hierbei sollten maximal ein Millimeter der *Sclera* bestehen bleiben. Nachfolgend wurde die abgetrennte Hornhaut nochmals in PBS gespült. Zur Erstellung einer Kontrollgruppe wurden derartig präparierte *Corneae* für drei Tage in *Human Endothelial Serum Free Medium* (SFM) kultiviert. Für die Kryokonservierung wurden die *Corneae* nach der Präparation in ein mit 1,5 ml Kryokonservierungsmedium gefülltes, Kryoröhrchen überführt

und für 24 h bei -80 °C eingefroren. Zuletzt wurden die Proben in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

### 3.2.1.3 Kryokonservierung der *Cornea*

Aus vorhergehenden Versuchen der Arbeitsgruppe gingen sechs verschiedene Kryokonservierungsmedien hervor [Müller, 2012]. Diese zeigten an einzelnen Zellarten, die zur Besiedlung der Mundschleimhautkonstrukte genutzt werden eine gute kryoprotektive Wirkung (Tabelle 1, 2 bis 7).

Sowohl zur Kryokonservierung von Spenderhornhäuten als auch in der Zellkultur wird standardmäßig das Kryoprotektanz Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet [Wusteman et al., 1997]. Aus diesem Grunde wurde als Kontrollgruppe ein DMSO-haltiges Medium mitgeführt (Tabelle 1, 1). Alle Kryoprotektanzen wurden im Basismedium 1:1 (BM 1:1) gelöst. Für jedes dieser sieben Kryokonservierungsmedien wurden 15 *Corneae* eingefroren und bis zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt in flüssigem Stickstoff gelagert.

**Tabelle 1** Übersicht der verwendeten Kryoprotektanzen

In der Tabelle sind die verwendeten Kryoprotektanzen in den eingesetzten Konzentrationen und die im Text benutzten Bezeichnungen dargestellt.

	Bezeichnung	Kryoprotektanzen
1	<b>DMSO+FKS</b>	5 % Dimethylsulfoxid und 10 % fetales Kälber Serum
2	<b>PD+MZ</b>	1,5 M 1,2-Propandiol und 5 mg/ml Methylzellulose
3	<b>ED+HES</b>	1,5 M 1,2-Ethandiol und 5 % Hydroxyethylstärke
4	<b>HEZ+HES</b>	10 mg/ml Hydroxyethylzellulose und 8 % Hydroxyethylstärke
5	<b>TRE+PVP</b>	0,3 M Trehalose und 200 mg/ml Polyvinylpyrrolidon
6	<b>PVP</b>	200 mg/ml Polyvinylpyrrolidon
7	<b>TRE</b>	0,3 M Trehalose

### 3.2.1.4 Auftauen der *Cornea*

Für die Kultivierung und spätere Anwendung histologischer und rasterelektronenmikroskopischer Analysen müssen die *Cornea*-Proben nach der Kryokonservierung aufgetaut werden.

Hierfür wurden die im flüssigen Stickstoff gelagerten Hornhäute für 2 min im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Des Weiteren wurden das zuvor hergestellte Kulturmedium (*Human Endothelial Serum Free Medium*, SFM) und Spülmedium (*Minimum Essential Medium*, MEM $\alpha$ ) im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Anschließend wurden die Hornhäute mit Hilfe einer Pinzette unter sterilen Bedingungen aus den Kryovials entnommen und in 6-Wellplatten

überführt. Im Folgenden wurden die Hornhäute zweimal 5 min und einmal 20 min mit je 7 ml MEM $\alpha$  gespült. Danach wurde das MEM $\alpha$  gegen das SFM-Kulturmedium ausgetauscht.

#### 3.2.1.5 Cornea-Organkultur

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass direkt nach dem Auftauen der *Cornea* keine Schädigung in der Endothelzellschicht vorliegt [Hagenah et al., 1989; Lehr et al., 1992]. Eventuelle Schädigungen durch die Entnahmeprozedur zeigen sich erst nach einigen Tagen. Aus diesem Grund werden die entnommenen Hornhäute vor einer Transplantation zunächst kultiviert, um stark geschädigte *Corneae* auszusondern. Auch in dieser Arbeit wurden deshalb die *Corneae* für drei Tage kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in *Human Endothelial Serum Free Medium*, welches mit 10 ng/ml *Fibroblast Growth Factor 2*, 50  $\mu$ g/ml Gentamicin, 2,5  $\mu$ g/ml Amphotericin B, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin versetzt wurde.

Die Hornhäute wurden für drei Tage im Brutschrank (HeraCell®, Heraeus instruments®) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre und unter leichtem Rütteln bei 100 rpm kultiviert [Küstner, 2005]. Nach ein bis zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Nach drei Tagen wurden die *Corneae* in 4 % neutral gepufferter Formaldehydlösung oder Glutaraldehyd-Formaldehyd-Lösung zum Zweck der histologischen Aufarbeitung fixiert.

#### 3.2.2 Histologische Methoden für Cornea-Proben

Um die Vitalität der aufgetauten *Corneae* anhand morphologischer Parameter zu beurteilen, wurden die Hornhäute histologisch präpariert. Für die Herstellung histologischer Präparate müssen Gewebe und Zellen verschiedenen Arbeitsschritten unterzogen werden. Hierfür werden die Präparate zuerst fixiert, entwässert, geschnitten und anschließend gefärbt. [Michels & Neumann, 2007]

Anhand der gefärbten Schnitt-Präparate wurde eine Stromastärkenmessung (Cell F, Soft Imaging System GmbH) und eine kategorisierte Epithel- und Endothelbefundung (Tabelle 2) durchgeführt. Mit Hilfe dieser Werte wurde auf die Funktionalität der Kryoprotektanzen geschlossen (siehe Kapitel 4.3 und 4.4).



**Tabelle 2 Kategorien für lichtmikroskopische Epithel- und Endothelbefundung**

Nach Betrachtung der Schnitt-Präparate wurden Kategorien für den Zustand von Epithel und Endothel eingeführt. Je mehr Punkte die Kategorie erhielt, desto besser war der Zustand der *Corneae*. Die Morphologie des Epithels wurde in drei Kategorien unterschieden, Epithel komplett vorhanden (●●●), unterste Schicht des Epithels vorhanden (●●) und Epithel abgelöst, beschädigt oder abgekugelt (●). Für das Endothel wurden folgende drei Kategorien festgelegt, Endothel intakt (○○○), Endothel vorhanden und gequollen (○○) und Endothel abgelöst oder Trümmer sichtbar (○).

Symbol	Kategorie
●●●	Epithel komplett vorhanden
●●	unterste Schicht des Epithels vorhanden
●	Epithel abgelöst, beschädigt/abgekugelt
○○○	Endothel intakt
○○	Endothel vorhanden/gequollen
○	Endothel abgelöst oder Trümmer sichtbar

### 3.2.2.1 Fixierung und Einbettung in Paraffin

Um die Autolyse des Gewebes zu verhindern und einen möglichst natürlichen Zustand des Gewebes zu gewährleisten, werden die Proben zuerst fixiert. Dabei kann ein Gewebe physikalischen oder chemischen Fixierverfahren unterzogen werden. Das Fixans ist meist eine chemische Verbindung die einen Teil des Gewebes, beispielsweise Proteine, vernetzt. Am häufigsten wird eine 4 %ige Formaldehydlösung verwendet. [Baumhoer et al., 2003]

Nach der Fixation folgt die Entwässerung der Proben. Dazu wird das Gewebe mit Alkohol infiltriert, wobei schrittweise die Alkoholkonzentration erhöht wird. Anschließend wird der Alkohol durch Xylol (organisches Lösungsmittel) ersetzt. Um die benötigte Härte der Proben für die Schnittpräparation zu erzielen, wird das Gewebe in Paraffin oder Kunststoff eingebettet. [Moll & Moll, 2006]

Für die Fixierung der *Cornea*-Proben wurden diese nach der Kultivierung mit PBS gespült und über Nacht in 4 % neutral gepufferter Formaldehydlösung chemisch fixiert. Anschließend wurde das Formaldehyd durch zweimaliges Spülen aus den Hornhäuten gewaschen und diese in einer aufsteigenden Alkoholreihe (1 h 50 % (v/v) Ethanol, 1 h 80 % (v/v) Ethanol, 1 h 90 % (v/v) Ethanol, 1 h 96 % (v/v) Ethanol, 2x 30 min Ethanol absolut) entwässert (TP 1020, Leica). Danach wurden die *Corneae* für 1 h in Xylol inkubiert und anschließend für 1 h in 65 °C warmes Paraffin (EG 1150 H, Leica) eingebettet.

### 3.2.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Bei der Anfertigung von Gewebeschnitten werden die in Paraffin eingebetteten Proben in feine Scheiben geschnitten. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schnitte für eine lichtmikroskopische Betrachtung maximal eine Dicke von 10 µm aufweisen [Baumhoer et al., 2003].

Für die Herstellung der Schnittpräparate wurden die zuvor angefertigten Paraffinblöcke in das Rotationsmikrotom (Microm HM 355S, Thermo Scientific) eingespannt und mit Hilfe eines automatischen Vorschubmechanismus 5 µm dicke *Cornea*-Querschnitte angefertigt. Diese Gewebeschnitte wurden auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen und für mindestens einen Tag im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

#### **3.2.2.3 Entparaffinierung und Rehydratisierung**

Histologische Färbungen werden durchgeführt um eine bessere Darstellung und Differenzierung von verschiedenen Gewebestrukturen zu erhalten. Zuvor müssen die getrockneten Gewebeschnitte entparaffiniert und rehydratisiert werden. Hierfür wurde durch zweimalige Inkubation in Xylol das Paraffin von dem Gewebe abgelöst. Danach erfolgt die Rehydratisierung in absteigender Alkoholreihe (5 min Ethanol absolut, 5 min 96 % (v/v) Ethanol, 5 min 80 % (v/v) Ethanol, 5 min 50 % (v/v) Ethanol, 2,5 min destilliertes Wasser), um anschließend die gewünschte Färbung durchzuführen.

#### **3.2.2.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, kurz HE-Färbung, ist ein weit verbreitetes Routineverfahren der Histologie und dient der Färbung verschiedener Strukturen eines Gewebeschnitts. Durch Hämatoxylin, genauer durch das Oxidationsprodukt Hämatein, werden Zellkern und Zytoplasmaanteile (basophile Strukturen) blau und durch Eosin andere Zytoplasmaanteile (acidophile Strukturen) rot gefärbt [Böck, 1989; Welsch, 2006].

Die zuvor entparaffinierten Schnitte wurden im ersten Färbeschritt für 5 min in Hämalan (Komplexverbindung von Hämatein mit Metallionen) inkubiert und anschließend für 10 min unter warmem fließenden Wasser gebläut. Das Bläuen erfolgt durch Anheben des pH-Werts und fixiert zugleich die Färbung, da Hämalan im neutralen und alkalischen Milieu nur schlecht wasserlöslich ist [Böck, 1989]. Im darauf folgenden Schritt wurden die Schnitte für 2 min in wässriger Eosinlösung inkubiert. Anschließend folgte eine erneute Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (3x 80 % (v/v) Ethanol, 3x 96 % (v/v) Ethanol, 3x Ethanol absolut) und eine Inkubation für zweimal 5 min in Xylol. Schließlich wurden die Schnitte mit Roti® Histokitt eingedeckt, mikroskopiert und fotodokumentiert (BX61, Olympus).

#### **3.2.3 Rasterelektronenmikroskopie für *Cornea*-Proben**

Für die Darstellung des Endothels der *Cornea* wurde die Rasterelektronenmikroskopie gewählt. Für die Präparation der Proben gelten zwei Voraussetzungen, die Proben müssen trocken und leitfähig sein. Jedoch können durch den hohen Wasserverlust während des Trocknungsprozesses strukturelle Veränderungen, wie beispielsweise Schrumpfung an den Proben entstehen. Aus diesem Grund wurden die Hornhäute vor der Trocknung mit Hilfe von Glutaraldehyd-

Formaldehyd-Lösung chemisch fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. [Böck, 1989]

Nach der Probenpräparation folgte die rasterelektronenmikroskopische Betrachtung. Mit Hilfe der entstandenen Aufnahmen wurde das Endothel der einzelnen *Corneae* begutachtet und je nach Zustand kategorisiert (Tabelle 3 und Kapitel 4.5).

**Tabelle 3 Kategorien für rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung**

Nach rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung der *Cornea*-Präparate wurden Kategorien für den Endothel-Zustand eingeführt, Endothel intakt, liegt an, hexagonale Form der Zellen (□□□□); Endothel gequollen, hexagonale Form der Zellen (□□□□); Endothel gequollen, Riesenzenen und hexagonale Zellen (□□□); Endothel gequollen, Riesenzenen, Verlust der hexagonalen Form (□□) und Endothel abgelöst/geplatzt und Zelltrümmer sichtbar (□). Je mehr Quadrate die Kategorie erhielt, desto besser war der Zustand der *Corneae*.

Symbol	Kategorie
□□□□□	Endothel intakt, liegt an, hexagonale Form der Zellen
□□□□	Endothel gequollen, hexagonale Form der Zellen
□□□	Endothel gequollen, Riesenzenen und hexagonale Zellen
□□	Endothel gequollen, Riesenzenen, Verlust der hexagonalen Form
□	Endothel abgelöst/geplatzt und Zelltrümmer sichtbar

#### 3.2.3.1 Fixierung und Entwässerung der *Cornea*-Proben

Für die Fixierung wurden die *Corneae*, nach einer dreitägigen Kultivierung in SFM, in PBS gespült und über Nacht in Glutaraldehyd-Formaldehyd-Lösung fixiert. Die Stocklösung des Fixans wurde aus 143 µl Glutaraldehyd, 3,4 g Saccharose und 99,857 ml Formaldehyd nach Böck (1989) angesetzt. Nach der Fixierung wurde die Glutaraldehyd-Formaldehyd-Lösung durch zweistündiges Spülen in PBS aus den Hornhäuten gewaschen und diese in einer aufsteigenden Ethanolreihe (6 h 30 % (v/v) Ethanol, 6 h 50 % (v/v) Ethanol, 6 h 60 % (v/v) Ethanol, 6 h 70 % (v/v) Ethanol, 6 h 80 % (v/v) Ethanol, 6 h 90 % (v/v) Ethanol, 6 h 96 % (v/v) Ethanol, 56 h Ethanol absolut) entwässert (TP 1020, Leica). Dabei wurde das in der *Cornea* enthaltene Wasser stufenweise gegen Ethanol ersetzt. Schließlich wurden die Hornhäute bis zur Kritisch-Punkt-Trocknung in Ethanol absolut gelagert und damit der Trocknungsprozess der Proben eingeleitet.

#### 3.2.3.2 Kritisch-Punkt-Trocknung der *Cornea*-Proben

Für eine erfolgreiche rasterelektronenmikroskopische Betrachtung der Hornhäute schloss sich nach Fixierung und Entwässerung der *Corneae* die Trocknung der Proben an. Dieser komplexe Schritt gewährleistet den vollständigen Wasserentzug und kann auf verschiedene Art und Weise durchgeführt werden. Proben mit einem geringen Wassergehalt können einer Lufttrocknung unterzogen und kleine Proben mit höherem Wassergehalt können unter Verwendung der

Gefriertrocknung präpariert werden. Die meisten biologischen Proben werden jedoch mittels Kritisch-Punkt-Trocknung bearbeitet [Mulisch & Welsch, 2010].

Der kritische Punkt jeder Flüssigkeit ist durch die kritische Temperatur und den kritischen Druck definiert, dabei liegen Gas und Flüssigkeit im Gleichgewicht vor. Bei der Kritisch-Punkt-Trocknung werden die Proben oberhalb des kritischen Punkts der Flüssigkeit getrocknet. In diesem Zustand sind Gas- und Flüssigkeitsphase nicht mehr voneinander zu unterscheiden [Latscha & Klein, 2002]. Da der kritische Punkt von Wasser (220 bar, 374 °C) nur durch große Druck- und Temperaturerhöhung zu erreichen ist, sind Gase wie CO<sub>2</sub> (73,8 bar, 31 °C) bevorzugt für biologische Proben einzusetzen [Mulisch & Welsch, 2010]. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von CO<sub>2</sub> in Wasser, wird als Zwischenmedium Alkohol genutzt, dieser infiltriert während der Entwässerung stufenweise die Probe. Das Phasendiagramm von CO<sub>2</sub> und darin der kritische Punkt von CO<sub>2</sub> ist nachfolgende zuerkennen (Abbildung 4).

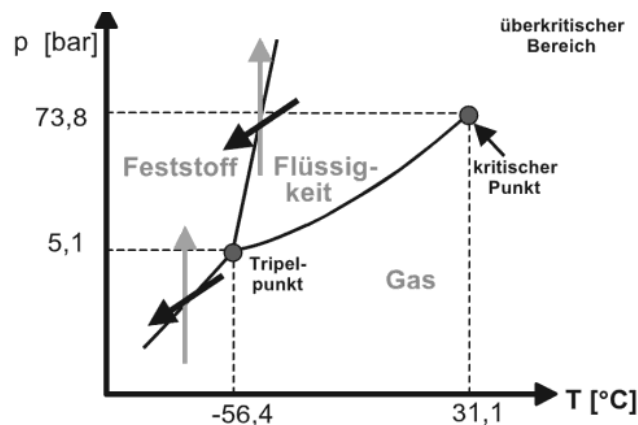


Abbildung 4 Phasendiagramm CO<sub>2</sub>

Das Phasendiagramm stellt die Druck- und Temperaturabhängigkeit des Aggregatzustands von CO<sub>2</sub> dar. Weiterhin zu entnehmen ist der kritische Punkt von CO<sub>2</sub> (73,8 bar und 31,1 °C). Am kritischen Punkt liegen Gas und Flüssigkeit im Gleichgewicht vor, erst oberhalb des kritischen Punkts sind beide Aggregatzustände nicht mehr voneinander unterscheidbar. Diese Eigenschaft wird bei der Kritisch-Punkt-Trocknung genutzt. [Hofmann, 2004]

Im ersten Schritt der Kritisch-Punkt-Trocknung wurden die *Cornea*-Proben in runde Gittergefäße schnellstmöglich, ohne Austrocknung, in die Probenkammer des Kritisch-Punkt-Trockners (CPD-030, Balzers Union AG) überführt. Anschließend wurde die mit 100%igen Alkohol gefüllte Probenkammer auf 4 °C herunter gekühlt und die CO<sub>2</sub>-Gasflasche geöffnet. An dieser Stelle wurde kontrolliert, dass alle Ventile am CPD geschlossen sind und die CO<sub>2</sub>-Flasche einen Druck von 50 bar aufweist. Nachdem die Kühlung der Kammer abgeschlossen war, wurde diese fest mit einem Deckel verschlossen und der Vorgang des Mediaustauschs konnte gestartet werden. Hierbei wurde durch Betätigen der Taste „Medium in“ flüssiges CO<sub>2</sub> in die Probenkammer gedrückt. Nach vollständiger Füllung der Kammer und Erreichen eines

Drucks von 50 bar wurde die Taste „Medium out“ zum Entleeren der Probenkammer bedient. Dabei wurde darauf geachtet, dass beim Entleeren die *Cornea*-Proben stets mit Medium bedeckt blieben und diese nicht austrocknen konnten. Anschließend wurde die Probenkammer erneut mit flüssigen CO<sub>2</sub> gefüllt. Dieser Vorgang wurde sechs bis acht Mal, je nach Probengröße und –anzahl, wiederholt. Im Anschluss daran, wurde die Kühlung der Kammer ausgestellt und der Prozess der Trocknung mittels Drücken der „Heating“-Taste begonnen. Mit Erhöhung der Temperatur auf circa 40 °C beginnt der Druck in der Kammer anzusteigen bis ein Druck von 80 bar erzielt wurde. Beim Erreichen dieses überkritischen Punkts wurde die „Gas out“-Taste betätigt. Mit Hilfe dieser Funktion konnte das Gas langsam aus der Probenkammer entweichen. Bei einem Druck von 0 bar konnte die Probenkammer geöffnet und die Hornhäute entnommen werden. Damit die *Corneae*-Proben nach der Kritisch-Punkt-Trocknung keine Luftfeuchtigkeit aufnehmen konnten, wurden diese in einen Exsikkator mit Cobaltdichlorid (CoCl<sub>2</sub>) überführt. Mittels des Exsikkators wurden die Proben zum Beschichten mit Gold transportiert.

#### **3.2.3.3 Beschichtung der Proben mit Gold**

Aufgrund der fehlenden Leitfähigkeit biologischer Proben besteht die Notwendigkeit einer Goldbeschichtung der *Cornea*-Präparate. Der Vorgang des Sputterns (*engl.: to sputter = zerstäuben*) ist ein Schichtherstellungsverfahren unter Vakuumbedingungen, bei dem durch Ionen Atome aus der negativ geladenen Kathodenoberfläche (Target) herausgeschlagen werden. Diese Atome setzen sich anschließend auf den zu beschichtenden Proben nieder, welche mit der positiv geladenen Anode in Verbindung stehen. Dazu wird mittels Hochspannung und Druck ein Gas, meist Argon, ionisiert. Die entstandenen positiven Ionen werden in einem elektrischen Feld auf das Target beschleunigt. Durch das Auftreffen der Argonionen am Target werden Atome aus der Kathode freigesetzt. Infolge einer Kondensationsreaktion der Atome bildet sich eine gleichbleibend dünne Schicht von etwa 2 bis 10 nm auf dem Präparat, welches dadurch seine Leitfähigkeit erlangt. In Abbildung 5 ist der schematische Aufbau und die prinzipielle Funktionsweise des Sputterns zu erkennen. [Gerlach et al., 2006; Kanani, 2009; Mulisch & Welsch, 2010]

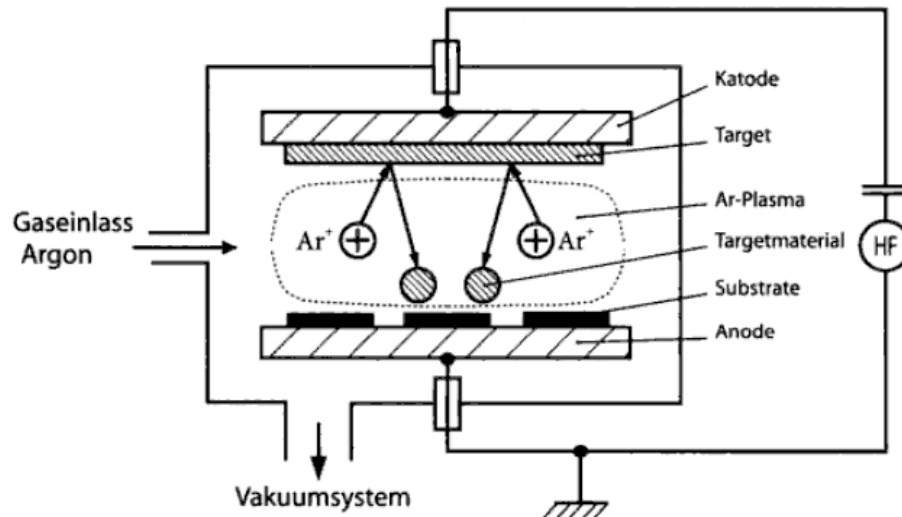


Abbildung 5 Sputterverfahren

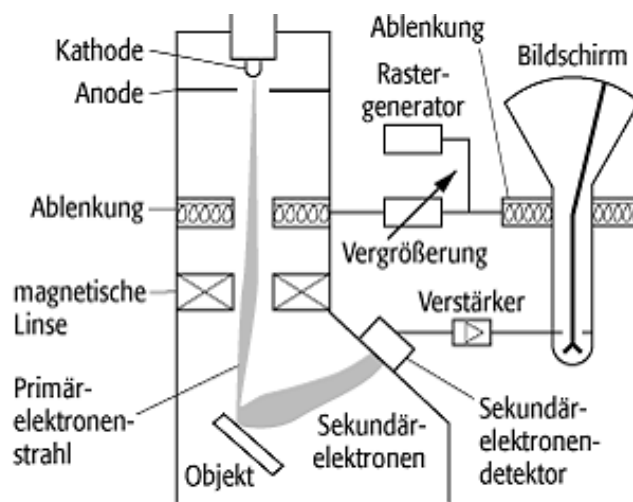
Dargestellt wird der schematische Aufbau des Sputterverfahrens. In der Vakuumkammer befinden sich die positive Anode mit den Präparaten, die negative Kathode mit dem Target und die Argonionen. Die durch eine angelegte Spannung beschleunigten Argonionen schlagen Atome aus dem Target. Zwischen den Elektroden entsteht ein Plasma und die Atome des Targets erzeugen eine Nanometer-dünne Schicht auf den Präparaten. [Gerlach et al., 2006]

Der Sputtervorgang wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Zu Beginn wurden die im Voraus kritisch-punkt-getrockneten *Corneae*, mit der Endothelseite nach oben, auf geeignete Stiftprobenteller mit Leit-C-Plast befestigt. Anschließend wurden die Präparate in den Sputter Coater (S150B, Edwards) überführt und der Sputtervorgang vorbereitet. Dazu wurde innerhalb der Vakuumkammer des Geräts ein Vakuum von 2 mbar erzeugt. Nach Erreichen dieses Vakuums wurde die Kammer mit Argongas gefüllt und erneut ein Vakuum von 2 mbar aufgebaut. Danach wurde der Druck in der Kammer auf 8 mbar eingestellt und der Sputtervorgang für 45 bis 60 Sekunden gestartet, wobei circa 40 mA und 0,7 kV anlagen. Die Sputterraten des Sputter Coater von Edwards bei einem Abstand von 30 mm beträgt 15 nm/min. Nach Abschluss des Vorgangs wurden die Proben entnommen und am unteren Rand mit Silberleitlack bestrichen. Der Silberleitlack dient zur Ableitung der im Rasterelektronenmikroskop (REM) entstehenden Ionen. Bis zur Betrachtung der Präparate im REM wurden diese in einer Halterung gelagert.

### 3.2.3.4 Rasterelektronenmikroskop

In der Elektronenmikroskopie verwendet man zwei verschiedene Typen von Mikroskopen, die Transmissionselektronenmikroskope (engl.: *transmission electron microscope*) und die Rasterelektronenmikroskope (engl.: *scanning electron microscope*). Die Möglichkeit hochauflösende Abbildungen der Proben zu erhalten und die Art des Versuchsaufbaus, führte zur Wahl der Rasterelektronenmikroskopie.

Ein REM ähnelt von der Art und Weise einem Auflichtmikroskop. Im Verhältnis dazu liegt der Vorteil des REMs in seiner großen Tiefenschärfe und seines Vergrößerungsbereichs von 10-fach bis 100.000-fach. Durch Anlegen einer Spannung an die Kathode werden Elektronen in Richtung der Proben beschleunigt. Die Kathode besteht zumeist aus einem 0,1 mm dünnen, gebogenen Wolframdraht oder einem Lanthanhexaboridstab. Die üblich verwendeten Beschleunigungsspannungen liegen zwischen 200 V und 50 kV. Der so entstandene Primärelektronenstrahl wird mittels elektromagnetischer Linsen gebündelt und auf der Probenoberfläche fokussiert. Die Ablenkspulen erzeugen ein Magnetfeld, sodass der Elektronenstrahl die Präparate Zeile für Zeile rastert. Trifft der Primärelektronenstrahl auf die Probe werden Elektronen emittiert, die sogenannten Sekundär- und Rückstreuelektronen. Diese Elektronen werden mit Hilfe des Sekundärelektronendetektors eingefangen und anschließend verstärkt. Durch eine synchrone, zeilenweise Aufzeichnung dieser Signale ergibt sich das eigentliche Bild. Im Folgenden ist der schematische Aufbau mit wesentlichen Baugruppen eines REMs dargestellt (Abbildung 6). [Michler & Lebek, 2004; Mulisch & Welsch, 2010; Skoog & Leary, 1996]



**Abbildung 6** Aufbau eines Rasterelektronenmikroskops

Zu erkennen ist der grundlegende Aufbau und die Funktionsweise eines Rasterelektronenmikroskops. Dabei wird durch Anlegen einer Spannung an der Kathode ein Primärelektronenstrahl erzeugt. Dieser wird mit Hilfe magnetischer Linsen gebündelt und auf den Proben fokussiert. Ablenkspulen ermöglichen das Rastern der Präparate. Durch Auftreffen der Primärelektronen auf der Probe werden Elektronen emittiert. Diese Sekundärelektronen werden mittels eines Detektors erfasst und ergeben nach Verstärkung das entsprechende Bild. [Misholi, 2010]

Nach Abschluss der Proben-Präparation wurde das Endothel der Hornhäute im Rasterelektronenmikroskop (XL-30 ESEM, Philips) betrachtet und mit Hilfe der XL Microscope Control (Philips) fotodokumentiert. Durch betätigen des „Vent“-Buttons wurde Stickstoff in die Probenbeobachtungskammer geleitet und somit das Vakuum entlassen. Anschließend wurden die Proben auf ihren Stiftprobentellern in die Probenhalterung des REMs

gesetzt und dieses verschlossen. Danach wurde durch Starten der Vakuumpumpe ein Hochvakuum von  $9 \cdot 10^{-5}$  mbar erzeugt und die Wolframkathode eingeschaltet. Im Anschluss daran wurden der geeignete Abstand zur Probe und die gewünschte Vergrößerung eingestellt. Die Fotodokumentation erfolgte nach Stabilisierung der Kathode bei einer Spannung von 20 kV.

#### **3.2.4 Mundschleimhautkonstrukte**

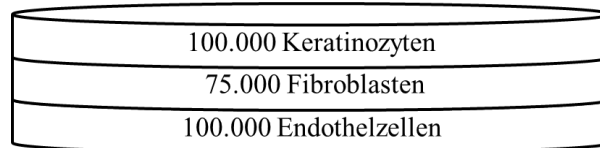
Die Entwicklung von autologen Mundschleimhautkonstrukten mittels Tissue Engineering und deren Anwendung stellt in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie eine Möglichkeit zur regenerativen Therapien dar. Dazu werden Kollagenträger (Scaffolds) gezielt mit typischen Mundschleimhautzellarten besiedelt und kultiviert. Bei autologen Transplantaten sind Spender und Empfänger äquivalent. Das heißt es wird einige Wochen vor der Transplantation eine Biopsie der Mundschleimhaut entnommen, gespült und desinfiziert. Anschließend wird die Biopsie zerkleinert und unter Verwendung von autologen Serum kultiviert. Danach wird der Zellrasen trypsiniert und als Sekundärkultur auf dem Scaffold ausgesät und kultiviert. Nach einigen Tagen können die Konstrukte transplantiert werden. [Lauer & Schimming, 2002]

Um die Besiedlung und Kultivierung der Konstrukte von der Transplantation in den Patienten zu entkoppeln, wurden sieben verschiedene Kryokonservierungsmedien (Tabelle 1) an den Konstrukten zum ultratiefen Einfrieren getestet. Je Kryokonservierungsmedium wurden drei Konstrukte besiedelt. Die Funktionalität der getesteten Kryoprotektanzen wurde mittels eines Proliferationsassays überprüft. Weiterhin wurde drei Konstrukte als Kontrollgruppe besiedelt. Diese drei Kontrollkonstrukte wurden nach der Kultivierung nicht eingefroren, sondern direkt dem Proliferationsassay zugeführt.

##### **3.2.4.1 Besiedlung der Mundschleimhautkonstrukte**

Die Besiedlung der Mundschleimhautkonstrukte erfolgte unter Verwendung von primären *humanen* Gingivafibroblasten (Fibrozyten), *Normal Human Epidermal Keratinocytes* (Keratinocyten) und *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* (Endothelzellen). Für die Besiedlung wurden die verschiedenen Zelltypen eine Woche vor Beginn in 12 ml zellspezifischem Medium in  $75 \text{ cm}^2$  Zellkulturflaschen expandiert. Anschließend wurden auf die Kollagenscaffolds zuerst 75.000 Fibroblasten und dann je 100.000 Keratinocyten und Endothelzellen ausgesät. Schematisch ist nachfolgend der Schichtaufbau der gezüchteten Mundschleimhauttransplantate dargestellt (Abbildung 7).





**Abbildung 7** Schichtaufbau der Konstrukte

Die natürliche Mundschleimhaut besteht aus verschiedenen Zellschichten. Daher werden die mittels Tissue Engineering hergestellten Konstrukte mit drei typischen Mundschleimhautzellarten besiedelt. Keratinozyten sind Zellen der obersten Mundschleimhautschicht und bilden die erste Schicht der Konstrukte. Fibroblasten sind Bestandteil der *Lamina propria*, einer bindegewebsartigen Schicht der Mundschleimhaut. Endothelzellen bilden die unterste Schicht der Gewebeäquivalente und simulieren die Zellen der Blutgefäße innerhalb der Mundschleimhaut.

Im ersten Schritt wurden die Kollagenkegel (CollaPlug, Zimmer Dental) in 2 mm dünne Scheiben geschnitten und in Basismedium 1:1 (BM 1:1) evakuiert. Dafür wurde 1 ml BM 1:1 in einer 12-Well-Platte vorgelegt und die Kollagenscheiben darin 20 min im Brutschrank (HeraCell®, Heraeus instruments®) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Bevor die Besiedlung mit Fibroblasten begann, wurde das Medium von den Kollagenscheiben abgesaugt und diese kurz mit sterilem Filterpapier getrocknet. Die Zellkulturflaschen der Fibroblasten wurden zwei Mal mit PBS gespült und anschließend mit 2 ml Trypsin für 5 min im Brutschrank inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Hinzufügen von 6 ml Trypsin-Stopp je Zellkulturflasche beendet. Nach dem Ernten der Zellen wurden diese für 5 min bei 1100 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus instruments®) und je nach Pelletgröße in 1 bis 3 ml BM 1:1 resuspendiert. Danach wurden 20 µl der Zellsuspension in 10 ml CASYton verdünnt und mittels des Cell Counters (CASY® Model TT, Schärfe System) gezählt. Die Zellzahl wurde auf das Gesamtvolumen hochgerechnet und das Volumen, das 75.000 Fibroblasten entsprach auf die Kollagenscheiben pipettiert. Nachdem auf alle Konstrukte je 75.000 Fibrozyten ausgesät wurden, adherieren diese für zwei Stunden bei 37 °C und 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Nach dieser Inkubationszeit folgte die Besiedlung der Konstrukte mit Keratinozyten. Diese wurden in derselben Art und Weise wie die Fibroblasten geerntet und mit einer Dichte von 100.000 Zellen pro Konstrukt ausgesät. Es folgte eine weitere zweistündige Inkubation der Konstrukte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre. Um die Besiedlung mit Endothelzellen fortzusetzen, wurden im Anschluss die Konstrukte in den 12-Wellplatten um 180 ° gedreht. Die Zellen wurden wie oben beschrieben präpariert und mit einer Dichte von 100.000 Endothelzellen ausgesät. Nach einer weiteren zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre wurden die Konstrukte in 1 ml BM 1:1 für vier Tage kultiviert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel. Im Anschluss wurden die Kontrollkonstrukte direkt dem Proliferationsassay zugeführt und die übrigen besiedelten Kollagenscheiben in den oben genannten sieben Kryoprotektanzien (Tabelle 1) eingefroren (siehe Kapitel 4.1).

#### 3.2.4.3 Kryokonservierung der Mundschleimhautkonstrukte

Für die Entwicklung von autologen Mundschleimhautkonstrukten werden den Patienten kleine Stücke gesunder Mundschleimhaut entnommen. Diese Biopsie erfolgt mehrere Wochen vor der Transplantation des Gewebeäquivalents. Mittels Tissue Engineering entwickelte Transplantate werden für jeden Patienten individuell hergestellt und können aufgrund begrenzter Zellproliferation und –vitalität nicht gelagert werden. Um den Erfolg der Transplantation zu gewährleisten muss das Mundschleimhautkonstrukt jedoch zu dem gewünschten Zeitpunkt proliferativ, vital und differenziert sein. Aus diesem Grund besteht die Notwendigkeit einer Lagerungsmethode und somit der Entkopplung von Besiedlung und Transplantation der Mundschleimhautkonstrukte. Eine geeignete Methode stellt dabei die Kryokonservierung dar. Jedoch ist die Kryokonservierung von kompletten Geweben weniger gut etabliert als die von Zellsuspensionen. [Spoerl et al., 2008]

Die Kryokonservierung der mit Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen besiedelten Konstrukte erfolgte nach folgendem Schema. Zuerst wurden die verwendeten Kryokonservierungsmedien (Tabelle 1) hergestellt und jeweils 1,5 ml in Kryovials vorgelegt. Anschließend wurden die Gewebeäquivalente in Kryovials überführt. Daraufhin wurden die Kryovials gezielt unter Verwendung einer Einfrierhilfe gefüllt mit Isopropanol (Nalgene® Mr. Frosty, Sigma-Aldrich) auf -80 °C gekühlt. Die verbleibenden Kontrollkonstrukte wurden ohne Kryokonservierung direkt dem Proliferationsassay zugeführt.

#### 3.2.4.4 Auftauen der kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukte

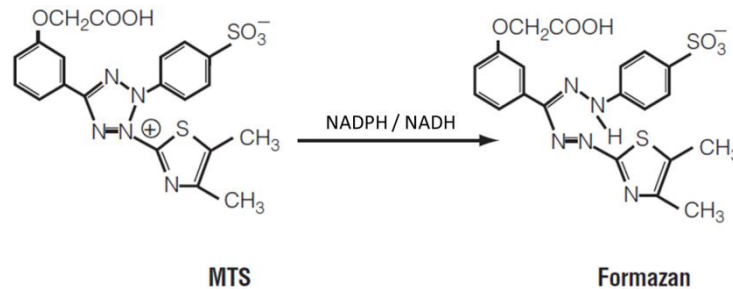
Für die Analyse der Schutzwirkung der verschiedenen Kryokonservierungsmedien mittels Proliferationsassay wurden die Mundschleimhautkonstrukte nach Lagerung bei -80 °C aufgetaut. Hierfür wurden die Kryovials für 2 min im Wasserbad bei 37 °C aufgewärmt. Danach wurden die Konstrukte unter sterilen Bedingungen mittels Pinzette in 12-Wellplatten überführt und dreimal 5 min mit BM 1:1 gespült. Anschließend folgte die Kultivierung für 48 h in BM 1:1 bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre (HeraCell®, Heraeus instruments®). Nach zweitägiger Kultivierung wurden die Konstrukte mittels Proliferationsassay untersucht.

#### 3.2.4.5 Proliferationsassay

Die Proliferation (*lat.: proles = Nachwuchs, lat.: ferre = tragen*) von Zellen bezeichnet den Prozess der Teilung und des Wachstums. Das hierzu genutzte Zellproliferationsassay ist ein kolorimetrisches Verfahren, um die Anzahl lebender Zellen in der Proliferation zu bestimmen.

Das CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) enthält eine Tetrazolium-Verbindung (MTS), welche von lebenden Zellen durch Reduktion in ein farbiges Formazan-Produkt umgewandelt wird. Diese Reduktion wird durch die Reduktionsäquivalente

NADPH und NADH ermöglicht, welche durch Dehydrogenasen in metabolisch aktiven Zellen produziert werden (Abbildung 8). Die bei 492 nm gemessene Absorption des Formazan-Produkts ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. [Promega, 2009]



**Abbildung 8**      metabolische Reaktion im Proliferationsassay

Das CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay ist ein kolorimetrisches Verfahren und wird zum Nachweis für proliferative Zellen genutzt. Dieses Assay beinhaltet eine Tetrazolium-Verbindung (MTS), welche durch NADPH und NADH in Formazan umgewandelt wird. Formazan ist ein Redox-Indikator, der im reduzierten Zustand Purpur erscheint. Die Umwandlung von MTS in Formazan ist direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen und die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. [Promega, 2009]

Nach Kryokonservierung und anschließender Kultivierung der besiedelten Konstrukte wurden diese mittels des Proliferationsassays auf Vitalität geprüft. Dazu wurde das Kulturmedium (Basismedium 1:1, BM 1:1) abgesaugt und je Konstrukt 80 µl Proliferationsreagenz zu 400 µl BM 1:1 pipettiert. Daraufhin folgte eine vierstündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> angereicherter Atmosphäre. Anschließend wurde eine Zweipunktmessung mit Hilfe eines Plate Readers (Anthos Reader 2010, Anthos Mikrosysteme GmbH) durchgeführt. Hierfür wurden pro Konstrukt zweimal 200 µl in eine 96-Wellplatte pipettiert und die Absorption bei 492 nm gemessen. Zusätzlich wurden 400 µl reines BM 1:1 mit 80 µl CellTiter 96® versetzt und Absorptionswerte für die Hintergrundkontrolle ermittelt. Die gemessenen Absorptionswerte wurden anschließend mittels SigmaPlot (Version 12.0, Systat Software GmbH) ausgewertet.

### 3.2.5 Analyse und Statistische Tests

Die Durchführung eines Proliferationsassays ermöglichte die Beurteilung der Revitalisierung der in den Kryokonservierungsmedien eingefrorenen Mundschleimhautkonstrukte. Zur statistischen Analyse dieser Daten wurde eine *One Way Repeated Measures Analysis of Variance* (OW RM ANOVA) (SigmaPlot: Version 12.0, Systat Software GmbH) durchgeführt. Mit Hilfe eines multiplen Vergleichs (*Holm-Sidak Methode*) erfolgte die Selektion der Behandlungsgruppen, welche sich signifikant ( $P \leq 0,05$ ) von der Kontrollgruppe unterscheiden.

Die Beurteilung der Vitalität und strukturellen Integrität der *Cornea* nach der Kryokonservierung erfolgte durch Auswertung der angefertigten HE-Gewebepräparate, Stromastärkenmessung und Oberflächenanalyse des Endothels. Die statistische Auswertung

dieser Ergebnisse erfolgte unter Anwendung einer *Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks* (Friedman RM ANOVA) (SigmaPlot: Version 12.0, Systat Software GmbH). Mit Hilfe eines multiplen Vergleichs (*Dunnnett's Methode*) erfolgte die Selektion der Behandlungsgruppen, welche sich signifikant ( $P \leq 0,05$ ) von der Kontrollgruppe unterscheiden.

Als Kontrollgruppe für *porcines Cornea*-Gewebe wurden nativ fixierte und nativ kultivierte Hornhäute etabliert. Für die statistische Ermittlung möglicher Unterschiede zwischen nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* wurde ein *Wilcoxon Signed Rank Test* angewendet. Wobei statistisch signifikante Unterschiede mit  $P \leq 0,03$  bestätigt wurden.

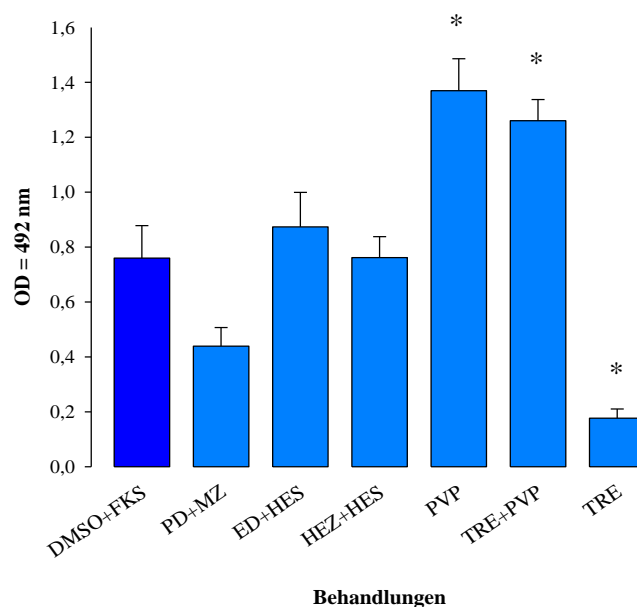
Im anschließenden Kapitel erfolgen die Darstellung aller in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse und deren statistische Auswertung.

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden nicht zytotoxische Kryokonservierungsmedien an Geweben getestet. Dazu wurde die Schutzwirkung der Substanzen zunächst an *in vitro* hergestellten Mundschleimhautkonstrukten untersucht. Anschließend wurde die Wirksamkeit der Kryokonservierungsmedien am Beispiel der *porcinen Cornea* experimentell geprüft. Mit Hilfe von licht- und rasterelektronenmikroskopischen Methoden wurde sowohl eine Epithel- und Endothelbefundung als auch eine Stromastärkenmessung zur Bestimmung der Vitalität der *Corneae* durchgeführt. Die Revitalisierung von kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukten wurde unter Verwendung eines Proliferationsassays ermittelt. Im Folgenden werden die Ergebnisse beschrieben und unter Verwendung von statistischen Analysen ausgewertet.

## 4.1 Revitalisierung kryokonservierter Mundschleimhautkonstrukte

Die gezüchteten Gewebeäquivalente wurden in sieben ausgewählten Kryokonservierungsmedien eingefroren (Tabelle 1). Zur Beurteilung der Vitalität der Konstrukte nach dem Auftauen wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Die ermittelten Absorptionswerte der kryokonservierten Gewebeäquivalente sind im nachfolgenden Diagramm (Abbildung 9) dargestellt. Des Weiteren wurden die Vitalität von uneingefrorenen Kontrollkonstrukte den besten Resultaten der Revitalisierung von kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukte gegenübergestellt (Abbildung 10).



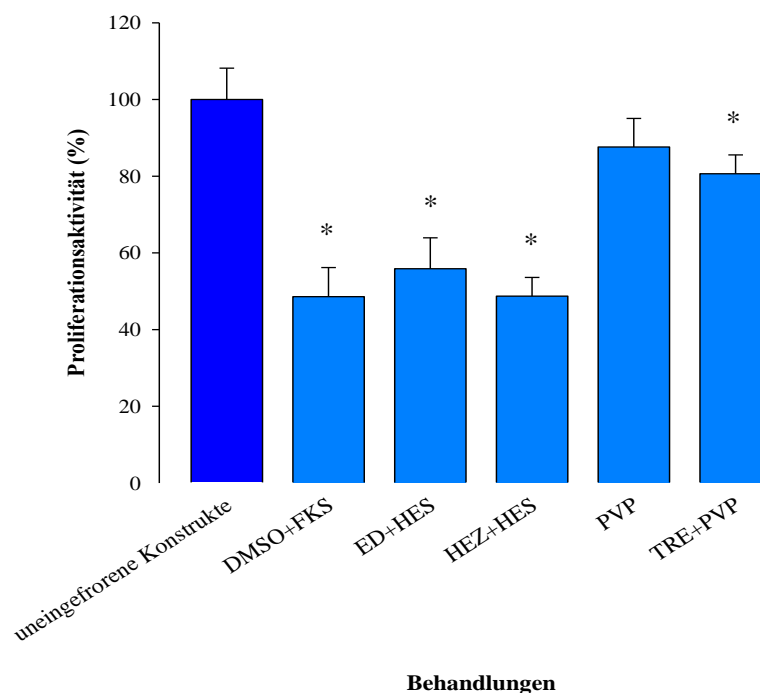
**Abbildung 9** Absorptionswerte von kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukten

Darstellung der gemessenen Absorptionswerte (in nm) für kryokonservierte Gewebeäquivalente (MW, SEM). Mit  $P \leq 0,05$  (\*) wurden signifikante Unterschiede zwischen der Kryokonservierung im Standardmedium DMSO+FKS und der Einfrierung in nicht zytotoxischen Medien ermittelt. Höhere OD-Werte bedeuten höhere Vitalität der Zellen. Pro Versuchsgruppe wurden sechs Konstrukte untersucht.

Im Vergleich zu den im Standardmedium DMSO+FKS eingefrorenen Konstrukten wurden für die in PD+MZ und TRE kryokonservierten Gewebeäquivalente eine ein bis zwei Drittel niedrigere Absorption ermittelt. Entgegen der bisher beobachteten Effekte von 1,2-Propandiol und Trehalose, zeigten diese Substanzen bei der Konservierung von Mundschleimhautkonstrukten damit eine unzureichende Schutzwirkung. Die Behandlungen mit ED+HES und HEZ+HES erzielten ähnlich gute Absorptionswerte wie DMSO+FKS und damit eine ausreichende kryoprotektive Wirkung für die Gewebeäquivalente. Für die in den Medien PVP und TRE+PVP eingefrorenen Konstrukte wurden im Vergleich zum Standardkryomedium DMSO+FKS annähernd doppelt so hohe Absorptionen gemessen. Dies lässt auf eine sehr gute kryoprotektive Wirkung dieser beiden Medien schließen.

Zur statistischen Auswertung der Absorptionswerte der in den sieben Medien kryokonservierten Gewebeäquivalente wurde eine *One Way Repeated Measures Analysis of Variance* (OW RM ANOVA) durchgeführt. Der multiple Vergleich (*Holm-Sidak Methode*) der Absorptionswerte der in DMSO+FKS und in den anderen untersuchten Medien kryokonservierten Konstrukte ergab für PVP, TRE+PVP und TRE signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha \leq 0,05$ . Wobei die in PVP und TRE+PVP eingefrorenen Gewebeäquivalente bessere und die in TRE kryokonservierten Konstrukte schlechtere proliferative Eigenschaften als die in DMSO+FKS Kryokonservierten zeigten. Für die Medien PD+MZ, ED+HES und HEZ+HES konnten keine signifikanten Unterschiede im Proliverationsverhalten der Konstrukte im Vergleich zu DMSO+FKS festgestellt werden ( $P > 0,05$ ). Dies bedeutet, dass diese Medien eine ähnlich gute Schutzwirkung für Mundschleimhautkonstrukte wie DMSO+FKS aufweisen.

Um anschließend den Einfluss der Kryokonservierung auf die Vitalität der Mundschleimhautkonstrukte nach dem Auftauen zu verdeutlichen, wurden die Ergebnisse der am besten funktionierenden Medien (ED+HES, HEZ+HES, PVP und TRE+PVP) den uneingefrorenen Kontrollkonstrukten gegenübergestellt (Abbildung 10). Die ermittelte Proliferationsaktivität der uneingefrorenen Kontrollkonstrukte diente als Bezugspunkt.



**Abbildung 10** Vergleich der besten Revitalisierungsergebnisse mit uneingefrorenen Kontrollkonstrukten

Darstellung der ermittelten Proliferationsaktivität (in %) der kryokonservierten Gewebeäquivalente im Vergleich zu uneingefrorenen Kontrollkonstrukten (MW, SEM). Mit  $P \leq 0,05$  (\*) wurden signifikante Unterschiede zwischen den kryokonservierten und uneingefrorenen Konstrukten ermittelt. Pro Versuchsgruppe wurden sechs Konstrukte untersucht.

Die in dem Standardkryomedium DMSO+FKS konservierten Konstrukte revitalisierten im Vergleich zu uneingefrorenen Kontrollkonstrukten im Mittel weniger als 50 %. Die in ED+HES und HEZ+HES konservierten Konstrukte revitalisierten ähnlich wie die im Kryokonservierungsmedium DMSO+FKS. Mit Abstand am besten revitalisierten die Konstrukte nach Konservierung in PVP. Diese Konstrukte erreichten fast 90 % der Proliferationsaktivität der uneingefrorenen Kontrollen. In Kombination mit PVP senkte Trehalose sogar die hervorragende kryoprotektive Wirkung von PVP.

Zur statistischen Auswertung der Proliferationsaktivitäten der Gewebeäquivalente wurde eine OW RM ANOVA durchgeführt. Mit Hilfe dieser Analyse sollte die Frage beantwortet werden, ob die Kryokonservierung Einfluss auf die Revitalisierung der Mundschleimhautkonstrukte hat. Der multiple Vergleich (*Holm-Sidak Methode*) der Revitalisierungsergebnisse von kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukten versus uneingefrorenen Kontrollkonstrukte ergab für die Medien DMSO+FKS, ED+HES, HEZ+HES und TRE+PVP signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha \leq 0,05$ . Jedoch kann für Mundschleimhautkonstrukte, die in TRE+PVP eingefroren wurden, eine kryoprotektive Wirkung tendenziell vermutet werden ( $P = 0,048$ ). Der Vergleich von nicht kryokonservierten Kontrollkonstrukten versus PVP konnte keinen signifikanten Unterschied ( $P = 0,146$ ) im Revitalisierungsverhalten zwischen den Konstrukten ermitteln. Folgerichtig ermöglicht das Medium PVP eine sehr gute kryoprotektive Wirkung für Mundschleimhautkonstrukte.

Zusammenfassend zeigte die Analyse des Revitalisierungsverhaltens der kryokonservierten Mundschleimhautkonstrukte, dass die Medien PD+MZ und TRE keine ausreichende Schutzwirkung ausübten. Wohingegen die in den Medien ED+HES und HEZ+HES eingefrorenen Konstrukte ähnlich gut revitalisierten im Vergleich zur Standardkryokonservierung in DMSO+FKS. Statistisch konnte bestätigt werden, dass die Gewebeäquivalente nach der Kryokonservierung in PVP und TRE+PVP die beste Revitalisierung zeigten.

Das Ziel der folgenden Versuche war es, die Schutzwirkung der Kryoprotektanzen an dem natürlichen Gewebe der *porcinen Cornea* zu evaluieren.



## 4.2 Untersuchung von uneingefrorenen *Corneae* als Kontrollgruppe

Die *Cornea* ist ein mehrschichtiges Gewebe, dessen Kryokonservierung derzeit eine große Herausforderung darstellt. Die Vitalität einer Hornhaut wird mit einer Endothelbefundung festgestellt. Da sich Zellschädigungen erst nach einigen Tagen einstellen, wird in der klinischen Anwendung eine Organkultur vorgenommen. Diese sieht eine *ex vivo* Kultivierung der *Cornea* für mehrere Tage vor. Aus diesem Grund wurden in meiner Arbeit die Hornhäute für drei Tage kultiviert. Um jedoch die bei der Kryokonservierung entstehenden Schädigungen am *Cornea*-Gewebe zu beurteilen, wurden im Anschluss alle kryokonservierten *Corneae* mit nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* verglichen. Die Fixierung nativer Hornhäute ermöglichte die Darstellung der natürlichen Morphologie der Gewebe-Schichten. Wohingegen mit Hilfe nativ kultivierter *Corneae* der Einfluss der Kultivierung beurteilt und charakterisiert werden konnte.

Mit Hilfe von Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Gewebeschnitten konnte die Morphologie der einzelnen *Cornea*-Schichten gut beurteilt werden. Besonderes Interesse galt hierbei der strukturellen Integrität der für die Transparenz und den Schwellungszustand der Hornhaut maßgeblichen Endothelzellschicht. Unter Einführung von Kategorien erfolgte der Vergleich des Epithel- und Endothelzustands von nativ fixierten und kultivierten *Corneae* (Tabelle 4).

**Tabelle 4** Ergebnis der lichtmikroskopischen Endothelbefundung für uneingefrorene *Corneae*

Nach lichtmikroskopischer Betrachtung der HE-Präparate wurden das Epithel und Endothel kategorisiert (Tabelle 2). Das Epithel der nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* war intakt (●●●), wohingegen Unterschiede im Endothelzustand beobachtet werden konnten. Das Endothel von nativ fixierten *Corneae* (○○○) wurde als intakt beurteilt, wobei das Endothel von nativ kultivierten *Corneae* leicht gequollen war (○○). Pro Versuchsgruppe wurden fünf Hornhäute beurteilt.

Behandlung	Epithel	Endothel	Anzahl
Native Fixation	●●●	○○○	5
Native Kultur	●●●	○○	5

Mikroskopisch war bei nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* das Epithel intakt (●●●) (Abbildung 11). Hingegen konnte im Quellungsverhalten des Endothels leichte Unterschiede zwischen nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* festgestellt werden. So wurde die Endothelzellschicht von nativ fixierten Hornhäuten als intakt eingestuft (○○○), da keine Quellung und Ablösung zu erkennen war. Demgegenüber zeigte das Endothel von nativ kultivierten *Corneae*, durch geringe Quellung und Abhebung, nur leichte morphologische Veränderungen (○○). Aus dieser Beurteilung des Epithels und Endothels waren demnach nur geringe Unterschiede für die *Cornea*-Vitalität festzustellen.

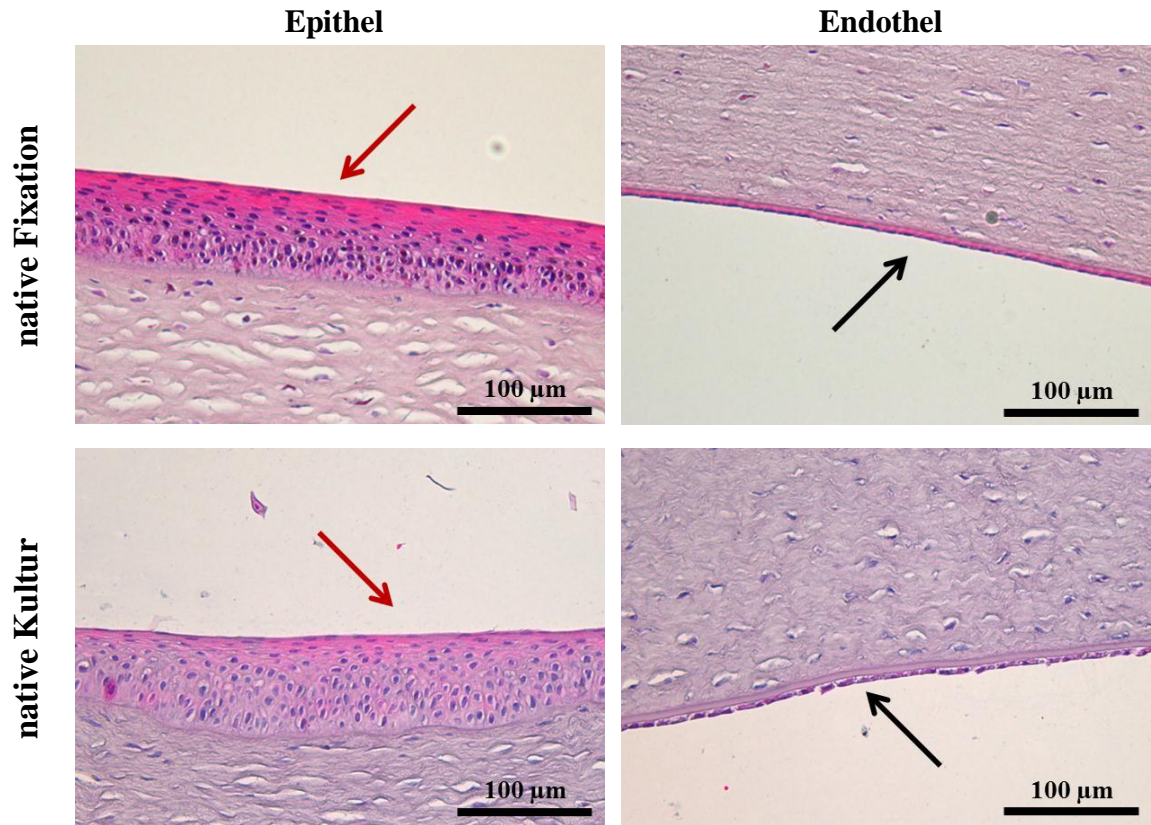


Abbildung 11 lichtmikroskopische Epithel- und Endothelbefundung von nativ fixierten und kultivierten *Corneae*

In den lichtmikroskopischen Aufnahmen der HE-Präparate ist der Epithel- und Endothelzustand von nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* dargestellt. Zu erkennen sind keine Unterschiede im Epithelzustand (roter Pfeil) und nur geringe Quellungsunterschiede im Endothelzustand (schwarzer Pfeil) zwischen nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae*. (Lichtmikroskop (BX61, Olympus), Vergrößerung 200x, Messbalken entspricht 100 µm)

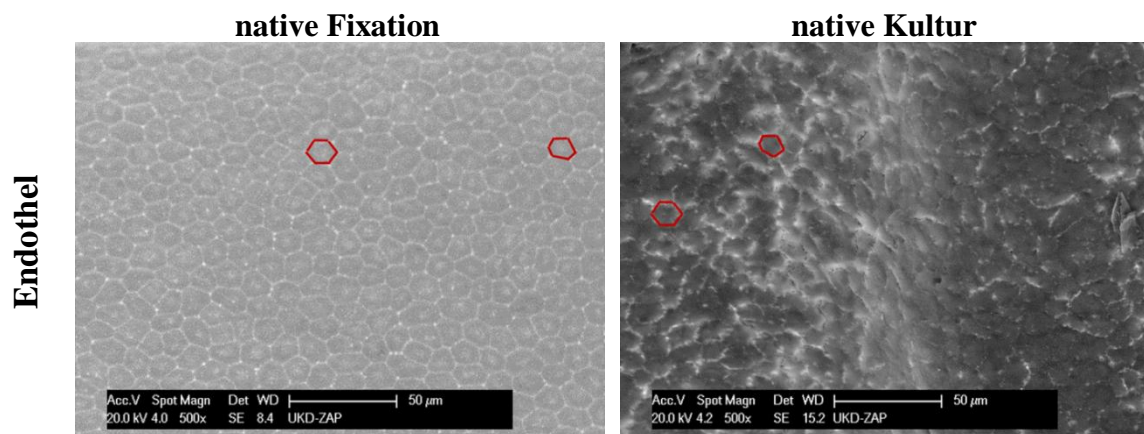
Die Auswertung der HE-Präparate erlaubte ausschließlich eine zweidimensionale Beurteilung der Hornhaut. Daher wurde anschließend eine rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung als Oberflächenanalyse durchgeführt. Unter Betrachtung der Morphologie der Endothelzellen wurden für nativ fixierte und nativ kultivierte *Corneae* folgende Kategorien eingeführt (Tabelle 5).

**Tabelle 5** Ergebnis der rasterelektronenmikroskopischen Endothelbefundung für uneingefrorene *Corneae*

Nach rasterelektronenmikroskopischer Beurteilung wurde das Endothel, als vitalitätsgebende Zellschicht quantitativ kategorisiert (Tabelle 3). Das Endothel nativ fixierter *Corneae* zeigte die natürlichste Morphologie (□□□□□), hingegen war das Endothel nativ kultivierter *Corneae* leicht gequollen (□□□□). Pro Gruppe wurden drei Hornhäute beurteilt.

Behandlung	Endothel	Anzahl
<b>Native Fixation</b>	□□□□□	3
<b>Native Kultur</b>	□□□□	3

Die natürlichste Morphologie für Endothelzellen – hexagonale Gestalt – zeigte das Endothel der nativ fixierten *Corneae* (□□□□□) (Abbildung 12). Der Einfluss der Kultivierung wird deutlich durch eine leicht veränderte Morphologie der Zellen und eine Quellung des Endothels (□□□□). Mit Hilfe dieser Oberflächenanalyse der Endothelzellschicht konnte somit der durch Betrachtung der HE-Präparate gewonnene Eindruck bestätigt werden.

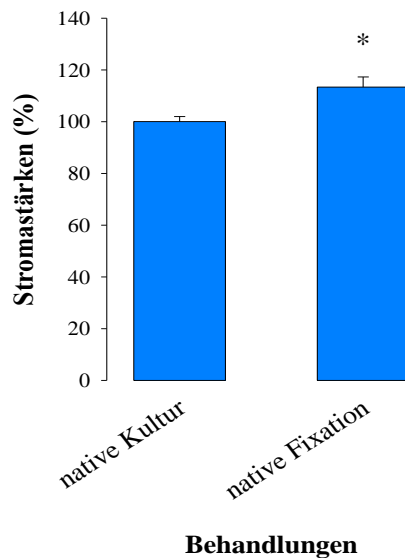


**Abbildung 12** rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung von nativ fixierten und kultivierten *Corneae*

In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen ist der Endothelzustand der nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* dargestellt. Bei nativ fixierten *Corneae* ist zu erkennen, dass die Endothelzellen eine intakte und regelmäßige hexagonale Form aufweisen (rot visualisiert). Die nativ kultivierten *Corneae* zeigten ein leicht gequollenes aber intaktes Endothel mit teilweiser hexagonaler Morphologie (rot visualisiert). (REM (XL-30 ESEM, Philips), Vergrößerung 500x, Messbalken entspricht 50 µm)

Für die Erörterung der Frage, ob die Kultivierung Einfluss auf das *Corneae*-Gewebe hat, wurden die Ablösung der Epithel- und Endothelschicht sowie die Endothelstruktur im Rasterelektronenmikroskop in Kategorien eingeteilt und die Stromastärke von uneingefrorenen Hornhäuten vermessen. Für die statistische Auswertung wurde ein *Wilcoxon Signed Rank Test* angewendet. Mit Hilfe dieser Analyse konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen nativ fixierten und nativ kultivierten *Corneae* ermittelt werden. Lediglich im Vergleich der gemessenen Stromastärken von nativ fixierten und kultivierten *Corneae* konnte ein statistischer Unterschied bestätigt werden ( $P = 0,030$ ) (Abbildung 13). Zu erkennen ist, dass nativ fixierte

Hornhäute im Mittel größere Stromastärken als nativ kultivierte *Corneae* aufwiesen, was einen Einfluss der Kultivierung auf die Quellung des *porcinen Cornea*-Gewebes bestätigt.



**Abbildung 13** Vergleich der Stromastärke von uneingefrorenen *Corneae*

Darstellung der ermittelten Stromastärken von uneingefrorenen *Corneae* (MW, SEM). Mit  $P \leq 0,03$  (\*) wurden signifikante Unterschiede zwischen den Stromastärken von nativ kultivierten und nativ fixierten *Corneae* ermittelt. Pro Versuchsgruppe wurden fünf *Corneae* vermessen.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde für die weiteren Untersuchungen an kryokonservierten und anschließend kultivierten *Corneae* die Versuchsgruppe von nativ kultivierten *Corneae* als Kontrolle verwendet.

### 4.3 Lichtmikroskopische Epithel- und Endothelbefundung von kryokonservierten *Corneae*

Die *Cornea* wurde neben dem Standardkryomedium DMSO+FKS in sechs verschiedenen Kryokonservierungsmedien eingefroren. Bei den ersten Begutachtungen der Hämatoxylin-Eosin-Präparate der in DMSO+FKS eingefrorenen *Corneae*, fiel die starke Schädigung der Epithel- und Endothelzellschichten auf. Um jedoch den Grad der Schädigung und damit die Schutzwirkung der Kryoprotektanzen zu quantifizieren, wurden jeweils fünf *Corneae* pro Kryokonservierungsmedium und der nativ kultivierten Kontrollgruppe unter Einführung von Kategorien (Tabelle 2) systematisch beurteilt (Tabelle 6).

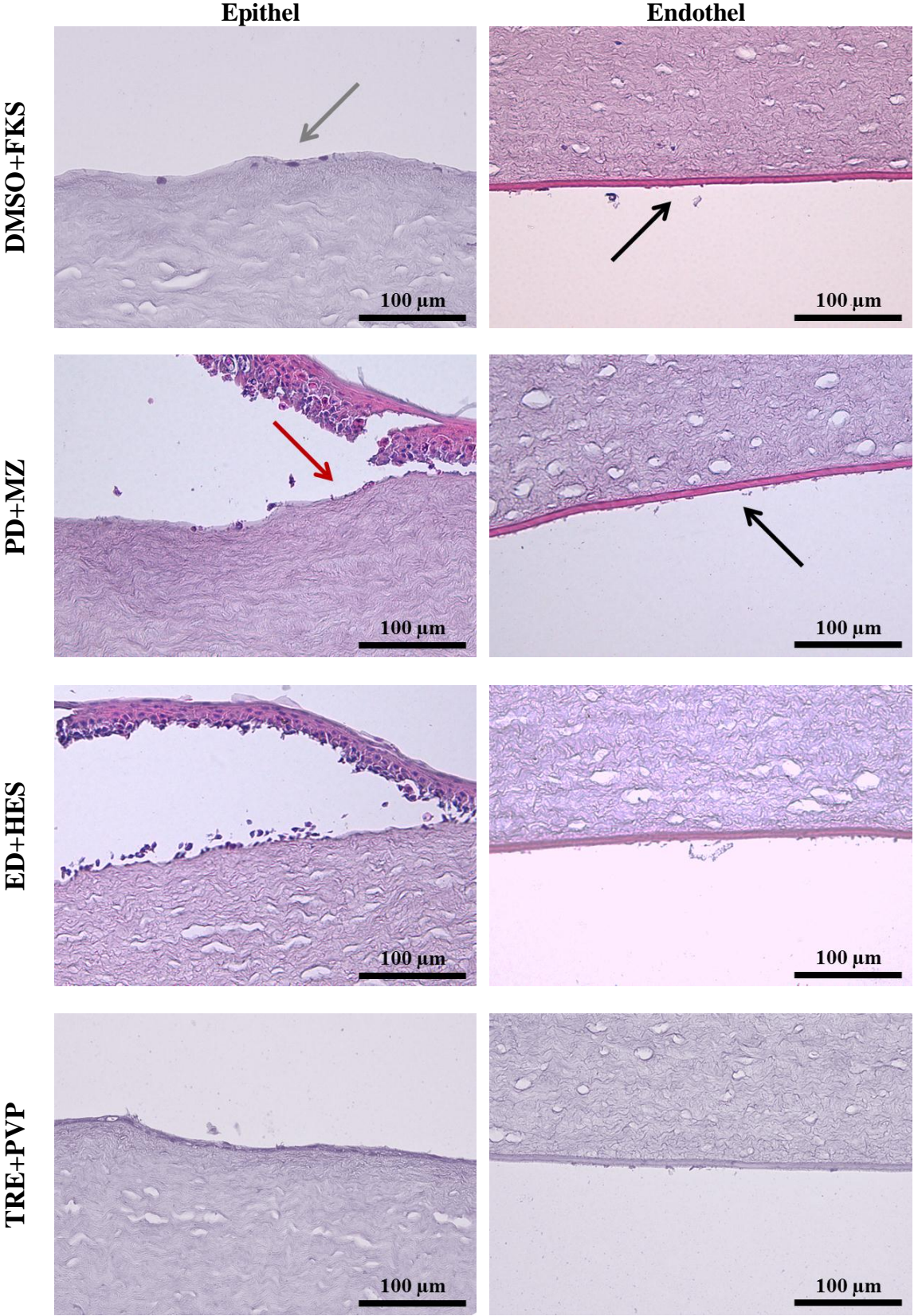
**Tabelle 6** Ergebnis der lichtmikroskopischen Epithel- und Endothelbefundung

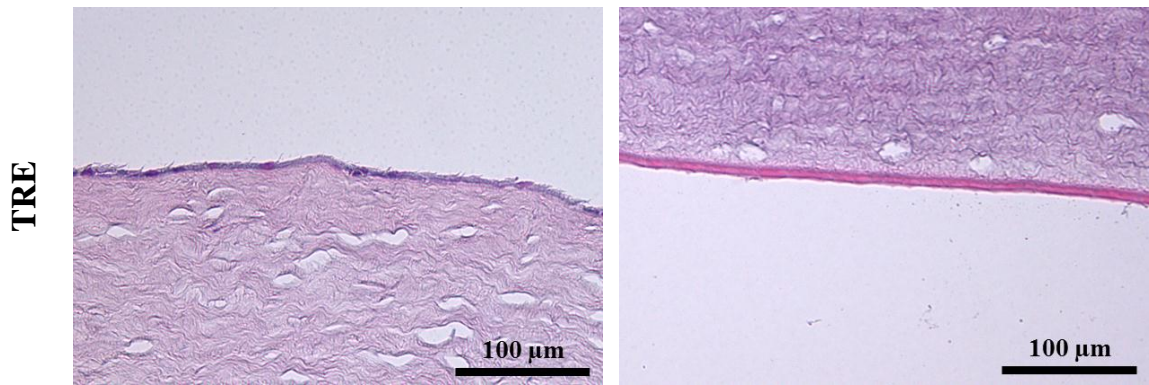
Nach Betrachtung der HE-Präparate wurden das Epithel und Endothel quantitativ kategorisiert (Tabelle 2). Das Epithel und Endothel der nativ kultivierten *Corneae* war intakt und leicht gequollen (●●● und ○○). Dem gegenüber war die Epithelschicht der kryokonservierten *Corneae* abgelöst (●) oder lediglich die unterste Schicht erkennbar (●●). Abgesehen von den Medien HEZ+HES und PVP, war vom Endothel ausschließlich Zelltrümmer sichtbar (○). Pro Versuchsgruppe wurden fünf Hornhäute beurteilt.

Behandlung	Epithel	Endothel	Anzahl
<b>Native Kultur</b>	●●●	○○	5
<b>DMSO+FKS</b>	●●	○	5
<b>PD+MZ</b>	●	○	5
<b>ED+HES</b>	●	○	5
<b>HEZ+HES</b>	●●	○○	5
<b>PVP</b>	●	○○	5
<b>TRE+PVP</b>	●●	○	5
<b>TRE</b>	●●	○	5

Mikroskopisch betrachtet waren im Vergleich zur Kontrollgruppe „native Kultur“ bei den in DMSO+FKS kryokonservierten *Corneae* vom Epithel die unterste Zellschicht (●●) und vom Endothel ausschließlich Zelltrümmer erkennbar (○). Eine gleiche Endothelzellmorphologie zeigten die in den Kombinationen PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und in TRE kryokonservierten Hornhäute (Abbildung 14). Lediglich bei der Betrachtung der Epithelschicht ergaben sich Unterschiede. So war bei den in TRE+PVP und TRE eingefrorenen *Corneae* die unterste Schicht des Epithels erkennbar (●●) und nur bei den in PD+MZ und ED+HES kryokonservierten *Corneae* löste sich das Epithel komplett (●).





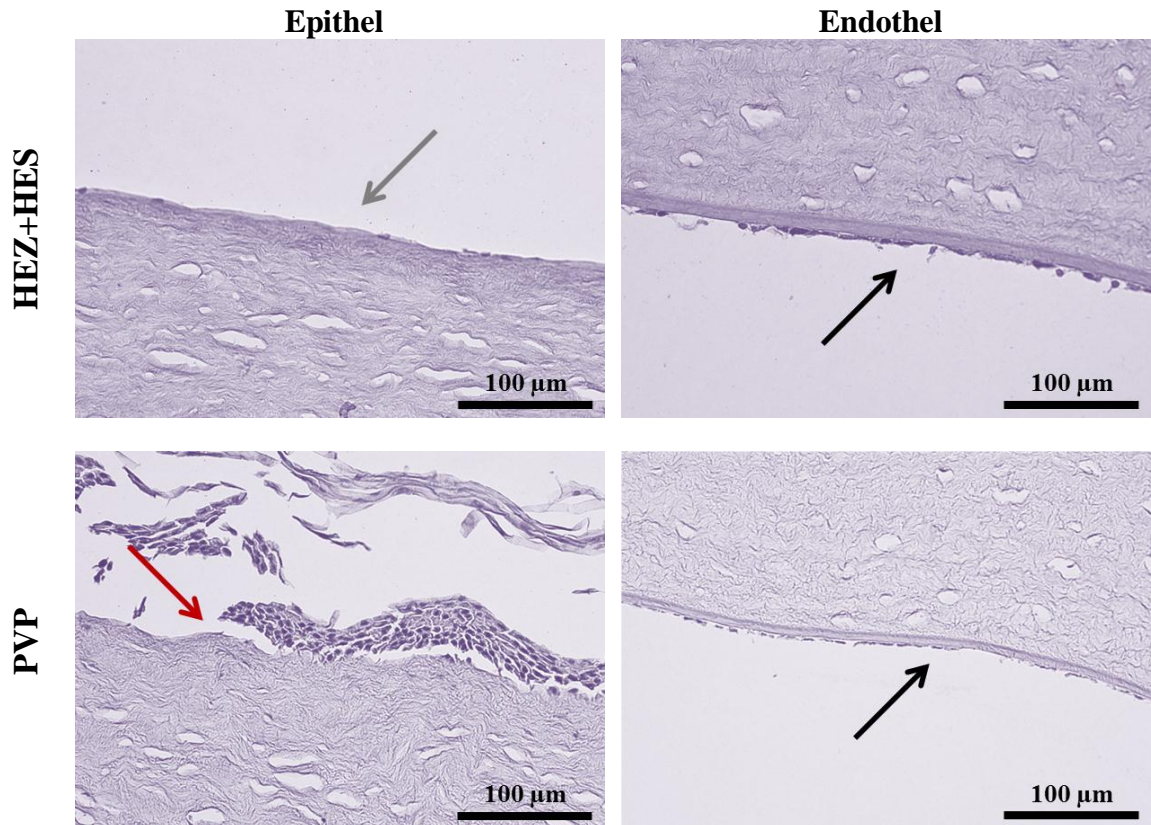


**Abbildung 14** Epithel- und Endothelbefundung von in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten *Corneae*

Die in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten *Corneae* zeigten untereinander eine ähnliche Morphologie der Epithel- und Endothelzellschicht. Zu erkennen ist, dass bei den in DMSO+FKS, TRE+PVP und TRE eingefrorenen *Corneae* die unterste Schicht des Endothels erhalten blieb (grauer Pfeil), wohingegen eine komplette Ablösung bei den in PD+MZ und ED+HES kryokonservierten *Corneae* stattfand (roter Pfeil). Das Endothel aller in diesen fünf Medien eingefrorenen *Corneae* zeigte ausschließlich Zelltrümmer (schwarzer Pfeil). (Lichtmikroskop (BX61, Olympus), Vergrößerung 200x, Messbalken entspricht 100 µm)

Den besten Endothelzustand nach der Kryokonservierung und anschließenden Kultivierung wiesen die in HEZ+HES und PVP eingefrorenen *Corneae* auf (Abbildung 15). Diese zeigten ein intaktes aber gequollenes Endothel (○○). Lediglich bei der Betrachtung der Epithelmorphologie ließen sich Unterschiede zwischen diesen beiden Behandlungen feststellen. So war bei den in HEZ+HES eingefrorenen *Corneae* die unterste Schicht des Epithels erkennbar (●●) und bei den in PVP kryokonservierten Hornhäuten löste sich das Epithel komplett (●). Infolge des guten Endothelzustands zeigten einzig die Medien HEZ+HES und PVP eine kryoprotektive Wirkung für das Gewebe der *porcinen Corneae*.





**Abbildung 15** Epithel- und Endothelbefundung von in HEZ+HES und PVP kryokonservierten *Corneae*

Bei den in HEZ+HES kryokonservierten *Corneae* ist die unterste Schicht des Epithels (grauer Pfeil) und das gequollene, aber größtenteils erhaltene Endothel (schwarzer Pfeil) zu erkennen. Dahingegen war bei den in PVP eingefrorenen *Corneae* die vollständige Ablösung des Epithels zu beobachten (roter Pfeil). Jedoch auch bei dieser Behandlung bleibt ein gequollenes Endothel zurück (schwarzer Pfeil). (Lichtmikroskop (BX61, Olympus), Vergrößerung 200x, Messbalken entspricht 100 µm)

Unter Verwendung der *Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks* (Friedman RM ANOVA) sollte die Frage geklärt werden, ob statistisch signifikante Unterschiede im Epithel- und Endothelzustand der kryokonservierten *Corneae* der sieben Versuchsgruppen im Vergleich zu nativ kultivierten *Corneae* vorliegen. Die Analyse der Kategorien der Epithelbefundungen (*Dunnnett's Methode*) ergab mit  $P \leq 0,05$  signifikante Unterschiede für die in den Medien PVP, ED+HES und PD+MZ kryokonservierten Hornhäute im Vergleich zur Kontrollgruppe „native Kultur“. Für die übrigen untersuchten Kryokonservierungsmedien DMSO+FKS, HEZ+HES, TRE+PVP und TRE konnten anhand der quantitativ festgelegten Befundungskategorien vergleichend zur Kontrolle keine Unterschiede im Epithelzustand statistisch bestätigt werden ( $P > 0,05$ ), wobei deutliche morphologische Veränderungen zu erkennen waren. Beim statistisch Vergleich der Kategorien des Endothelzustands von nativ kultivierten Hornhäuten zu kryokonservierten *Corneae* wurden mit  $P > 0,05$  keine Unterschiede ermittelt. Jedoch lässt sich aufgrund der errechneten Q-Werte eine Tendenz feststellen. Wobei für DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE höhere



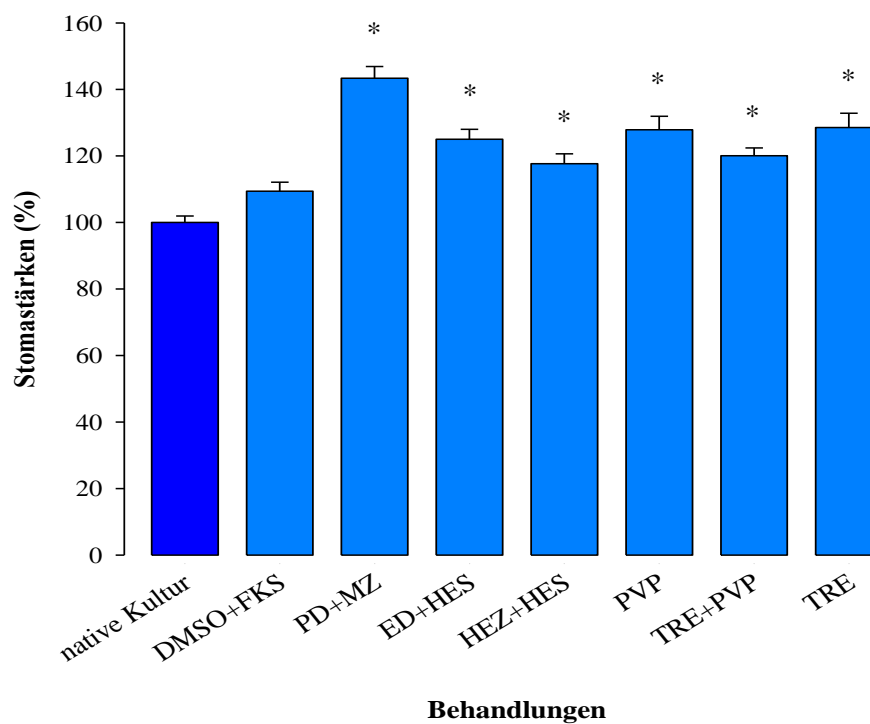
Q-Werte als für HEZ+HES und PVP berechnet wurden. Dies deutet auf Unterschiede in der Endothelbefundung und damit auf eine geringere protektive Wirkung dieser fünf Medien für das *Cornea*-Gewebe hin.

Zusammenfassend zeigte die Beurteilung der zweidimensionalen Gewebe-Schnitte der *Corneae*, dass von der Epithelschicht im besten Fall die unterste Schicht erhalten blieb und dass die Endothelzellschicht während der Kryokonservierung und anschließenden Kultivierung größtenteils abgelöst wurde. Wobei die Kryokonservierungsmedien HEZ+HES und PVP das beste Resultat erzielten und somit eine bessere Schutzwirkung als das Standardkryomedium DMSO+FKS für die *Cornea* ausübten.

Eine der wichtigsten Funktionen des Endothels ist die Entquellung des Stromas. Der Hydratationszustand des Stromas und damit die Transparenz der Augenhornhaut werden durch Pumpleistung der Endothelzellen gewährleistet. Unter Betrachtung der gewonnen Ergebnisse und dieser Eigenschaften, wurde nachfolgend als weiterer Vitalitätsmarker die Stromastärke vermessen und analysiert.

#### 4.4 Stromastärkenmessung von kryokonservierten *Corneae*

In der vorhergehenden Analyse wurde das Epithel und vor allem Endothel als vitalitätsbestimmende Zellschicht der Hornhäute an HE-Schnitten morphologisch untersucht. Aufgrund der Funktionalität des Endothels wurde anschließend der Quellungszustand des Stromas genauer analysiert. Hierfür wurden die HE-gefärbten *Corneae*-Gewebeschnitte verwendet und das Stroma mikroskopisch vermessen (Cell F, Soft Imaging System GmbH). Neben dem Stroma der kryokonservierten *Corneae* wurde das Stroma von nativ kultivierten *Corneae* als Kontrollgruppe vermessen und als Bezugspunkt gewählt (Abbildung 16).



**Abbildung 16** Ergebnis der Stromastärkemessung der *Cornea*-Proben

Darstellung der gemessenen Stromastärken (in %) von kryokonservierten *Corneae* im Vergleich zur Kontrollgruppe „native Kultur“ (MW, SEM). Mit  $P \leq 0,05$  (\*) wurden in sechs der sieben untersuchten Kryokonservierungsmedien signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ermittelt. Pro Versuchsgruppe wurden fünf Hornhäute vermessen.

Im Mittel wiesen alle kryokonservierten *Corneae* in Bezug auf die Kontrollgruppe „native Kultur“ ein gequollenes Stroma auf. Die größte Schwellung des Stromas wurde bei den in PD+MZ eingefrorenen *Corneae* ermittelt. Im Vergleich zur Kontrolle wurde für die in ED+HES, HEZ+HES, PVP, TRE+PVP und TRE kryokonservierten *Corneae* ein Stromastärkezuwachs von bis zu 25 % gemessen. Entgegen aller Vermutungen zeigten die in

DMSO+FKS eingefrorenen Hornhäute die geringste Schwellung und damit das positivste Resultat.

Für die Erörterung der Frage, ob die Kryokonservierung der *Corneae* Einfluss auf die Stromastärke ausübt, wurde eine Friedman RM ANOVA durchgeführt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe „native Kultur“ konnten signifikante Unterschiede ( $P \leq 0,05$ ) für die Stromastärke kryokonservierten *Corneae* in sechs der sieben untersuchten Kryokonservierungsmedien ermittelt werden (*Dunnett's Methode*). Grundsätzlich konnte somit ein Einfluss der Kryokonservierung auf die Stromastärke statistisch bestätigt werden. Der Vergleich der Stromastärke von nativ kultivierten *Corneae* zu den in DMSO+FKS kryokonservierten Hornhäuten ergab mit  $P > 0,05$  keine signifikanten Unterschiede. Aus diesem Ergebnis zeigt sich, dass die Kombination von DMSO und FKS vermutlich einen positiven Einfluss auf die Entquellung des Stromas nach der Kryokonservierung ausübt.

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die Kryokonservierung in den sieben untersuchten Medien die Quellung des Stromas negativ beeinflusst. Den geringsten Effekt zeigten die in DMSO+FKS kryokonservierten *Corneae*. Statistisch konnte der positive Effekt von DMSO und FKS auf den Hydratationszustand der *Corneae* nach dem Auftauen bestätigt werden.

Als eine weitere Methode zur quantitativen Endothelbefundung wurde im letzten Abschnitt die Rasterelektronenmikroskopie eingesetzt.

## 4.5 Rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung von kryokonservierten *Corneae*

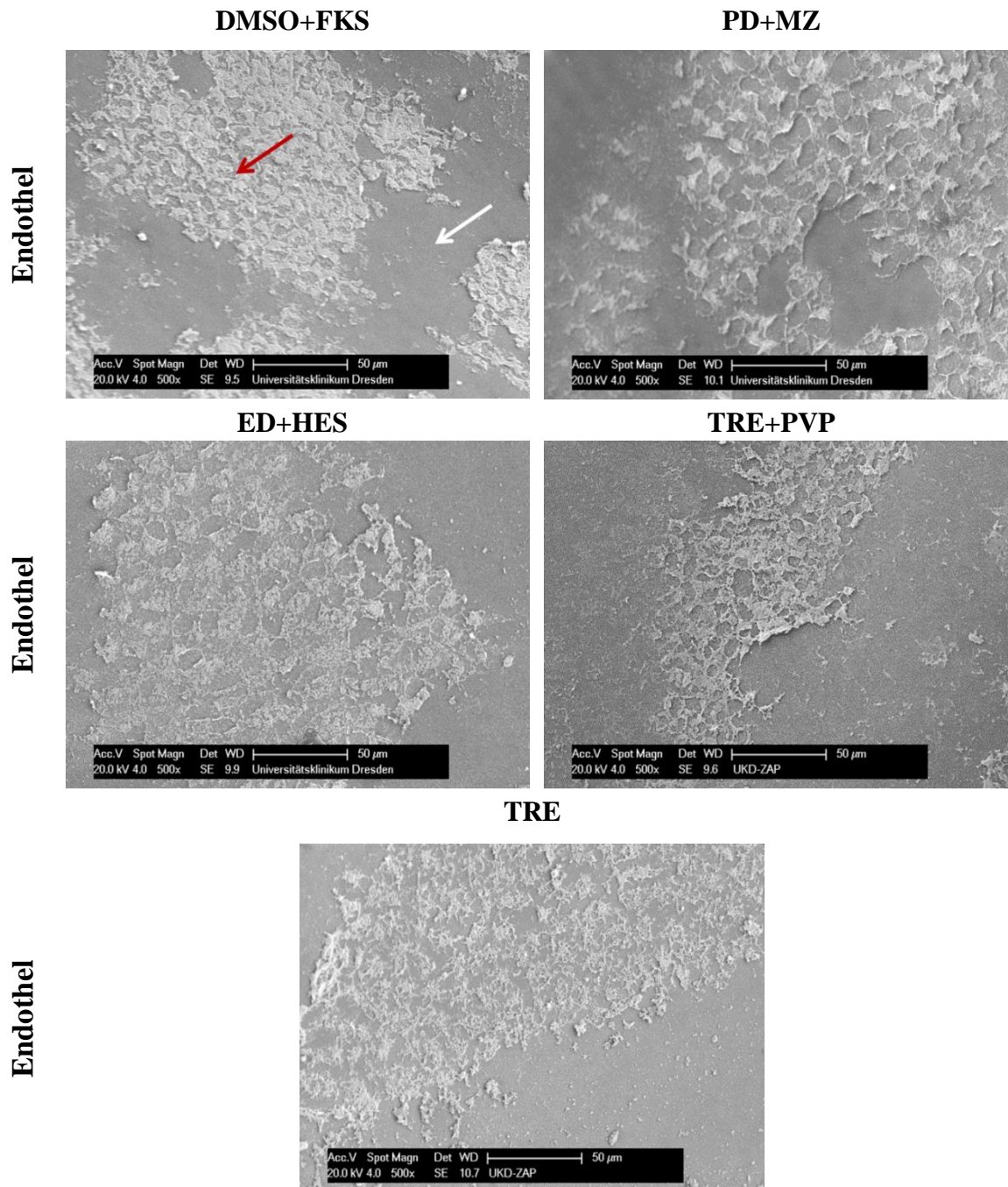
An den bisher beschriebenen HE-Gewebeschnitten konnte die Endothelbefundung ausschließlich am Querschnitt durchgeführt werden. Für die Oberflächenanalyse des Endothels wurde nun ein rasterelektronenmikroskopisches Protokoll für die *Corneae* etabliert. Als Bezugspunkt wurden ebenfalls nativ kultivierte *Corneae* als Kontrollgruppe verwendet. Die quantitativen Einschätzungen und Einteilung des Endothelzustands in Kategorien werden in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7** Ergebnis der rasterelektronenmikroskopischen Endothelbefundung

Nach rasterelektronenmikroskopischer Beurteilung wurde das Endothel, als vitalitätsgebende Zellschicht quantitativ kategorisiert (Tabelle 3). Das Endothel nativ kultivierter *Corneae* zeigte eine leicht gequollene aber intakte Zellschicht (□□□□). Demgegenüber wiesen die in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten *Corneae* den schlechtesten Endothelzustand (□) auf. Ähnlich zur Kontrollgruppe „native Kultur“ zeigten die in HEZ+HES und PVP kryokonservierten *Corneae* eine geschlossene Endothelschicht (□□□ und □□). Pro Versuchsgruppe wurden drei Hornhäute beurteilt.

Behandlung	Endothel	Anzahl
<b>Native Kultur</b>	□□□□	3
<b>DMSO+FKS</b>	□	3
<b>PD+MZ</b>	□	3
<b>ED+HES</b>	□	3
<b>HEZ+HES</b>	□□□	3
<b>PVP</b>	□□	3
<b>TRE+PVP</b>	□	3
<b>TRE</b>	□	3

Im Vergleich zu den nativ kultivierten *Corneae* wurde der schlechteste Endothelzustand bei den in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE eingefrorenen Hornhäuten dokumentiert (□) (Abbildung 17). Im Verlauf der rasterelektronenmikroskopischen Oberflächenbetrachtung dieser kryokonservierten *Corneae* wurde eine großflächige Endothelablösung beobachtet. Bei detaillierter Untersuchung waren in nur wenigen Bereichen noch Zelltrümmer erkennbar. Bezüglich der lichtmikroskopischen Analyse der HE-Präparate konnte das Fehlen der Endothelschicht bestätigt werden. Aufgrund dieser intensiven Zellschädigung kann davon ausgegangen werden, dass diese fünf Medien eine unzureichende kryoprotektive Schutzwirkung für *porcines Cornea*-Gewebe ausüben.



**Abbildung 17** Endothelbefundung von in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten *Corneae*

Die in DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten *Corneae* zeigten untereinander eine ähnliche Morphologie des Endothels. Zu erkennen ist, dass ein Großteil des Endothels abgelöst wurde (weißer Pfeil). Bei detaillierter Betrachtung waren ausschließlich Zelltrümmer als Überreste des Endothels zu erkennen (roter Pfeil). (REM (XL-30 ESEM, Philips), Vergrößerung 500x, Messbalken entspricht 50 µm)

Von den kryokonservierten *Corneae* zeigten die in PVP und HEZ+HES Eingefrorenen das beste Ergebnis. Morphologisch betrachtet war das Endothel durch Bildung von Riesenzellen vollständig geschlossen. Wobei neben den Riesenzellen sowohl gequollene hexagonale

Endothelzellen (□□□) als auch unförmige Zellen zu erkennen waren (□□) (Abbildung 18) Unter Hinzuziehen der Ergebnisse aus der lichtmikroskopischen Epithel- und Endothelbefundung konnte eine kryoprotektive Wirkung von HEZ+HES und PVP für die *porcine Cornea* bestätigt werden.

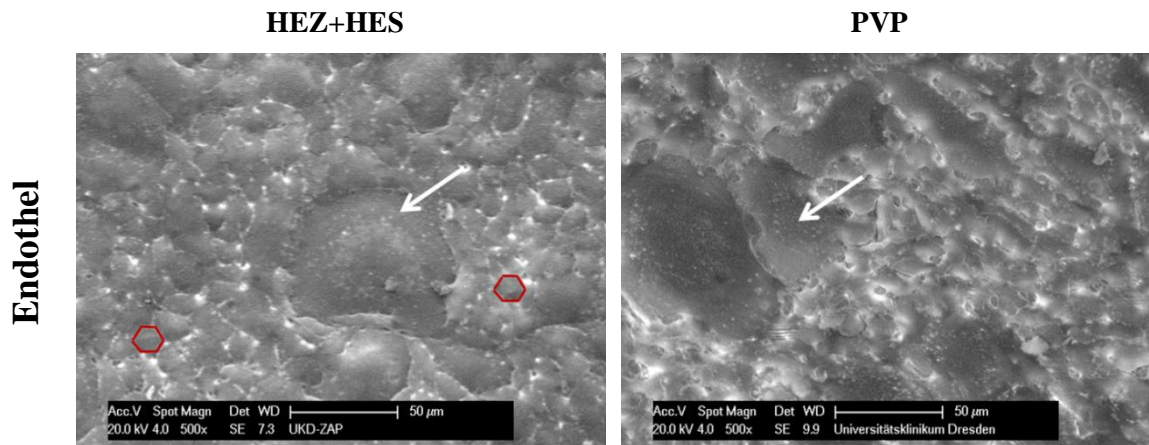


Abbildung 18 Endothelbefundung von in PVP und HEZ+HES kryokonservierten *Corneae*

Das Endothel der in HEZ+HES und PVP eingefrorenen *Corneae*, zeigte im Vergleich zur Kontrolle den besten Zustand. Morphologisch betrachtet war das Endothel durch Bildung von Riesenzellen (weißer Pfeil) vollständig erhalten. Neben den Riesenzellen wurde bei in PVP kryokonservierter *Corneae* ein Verlust der hexagonalen Form der Endothelzellen festgestellt. Wohingegen das Endothel der in HEZ+HES eingefrorenen *Corneae* hexagonale Zellen aufwies (rot visualisiert). (REM (XL-30 ESEM, Philips), Vergrößerung 500x, Messbalken entspricht 50 µm)

Auch diese Befundungskategorien wurden mit Hilfe der Friedman RM ANOVA statistisch analysiert. Es sollte die Frage beantwortet werden, ob die Kryokonservierung Einfluss auf den Endothelzustand der *Corneae* ausübt. Der Vergleich (*Dunnnett's Methode*) der Kategorien der Endothelbefundung für nativ kultivierte und kryokonservierte Hornhäute ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $P \geq 0,05$ ). Für die in den Medien DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE kryokonservierten *Corneae* wurden jedoch höherer Q-Werte als für die in HEZ+HES und PVP eingefrorenen *Corneae* ermittelt. Dies lässt auf Unterschiede in der Endothelbefundung und damit auf eine geringere Schutzwirkung dieser fünf Medien schließen. Demzufolge konnten die errechneten Q-Werte die morphologisch beobachtete Tendenz statistisch bestätigen.

Zusammenfassend zeigte die Oberflächenanalyse von kryokonservierten Hornhäuten, dass bei den Medien DMSO+FKS, PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE ausschließlich Zelltrümmer vom Endothel zurück bleiben. Hingegen zeigten die in HEZ+HES und PVP kryokonservierten *Corneae* ein durch Riesenzellen geschlossenes Endothel.

Nachfolgend werden alle Ergebnisse diskutiert und mit in der Literatur verfügbaren Erkenntnissen verglichen.

## 5 Diskussion

Die Verpflanzung von Hornhäuten ist mit 4.500 bis 6.000 die am häufigsten durchgeführte Transplantation in Deutschland. Nach Schätzungen der Deutschen Gesellschaft für Gewebetransplantation liegt jedoch der tatsächliche Bedarf bei etwa 8.000 Spenderhornhäuten pro Jahr [DGFG, 2012 a]. Eventuelle Schädigungen am vitalitätsgebenden Endothel durch die Entnahmeprozedur oder Gewebe-Kontamination zeigen sich allerdings erst nach einigen Tagen [Hagenah et al., 1989; Lehr et al., 1992]. Um zu stark geschädigte Hornhäute auszusondern, sieht die klinische Anwendung eine *ex vivo* Organkultur der *Cornea* für mehrere Tage im Vorfeld der Transplantation vor [Cunningham et al., 2012]. Für die Aufrechterhaltung der Funktionalität der *humanen Cornea* ist eine Endothelzelldichte von mindestens 300 - 800 Zellen/mm<sup>2</sup> nötig [Seeber, 2008], allerdings bestehen Augenbanken auf einer Zelldichte von mindestens 2.000 – 2.500 Zellen/mm<sup>2</sup> [Armitage, 2008]. Ein weiterer Grund für diese Kultivierung ist die Möglichkeit der Lagerung der Spenderhornhäute bis zum Zeitpunkt der Transplantation [Albon et al., 2000] und damit eine zeitliche Entkopplung des Prozesses. Eine Alternativmethode für die Langzeitlagerung von Zellen und Geweben ist die Kryokonservierung. Jedoch besteht die Schwierigkeit dabei vor allem in der hoch organisierten, oft komplexen Struktur der Gewebe, die das Durchdringen von kryoprotektiven Substanzen erschwert [Brockbank, 2002]. Aufgrund dieser Herausforderung ist die Kryokonservierung von Gewebe derzeit noch kein Stand der Technik. Jedoch wird es bereits partiell im Bereich der *humanen Cornea* angewendet [Capella et al., 1972].

Für die Beurteilung der bei der Kryokonservierung entstehenden Schäden am *Cornea*-Gewebe wurden zunächst nativ fixierte und nativ kultivierte Hornhäute untersucht. Dabei konnte mit Hilfe der rasterelektronenmikroskopischen Oberflächenanalyse bei nativ fixierten Hornhäuten ein vollständig intaktes Endothel beobachtet werden. Nach einer dreitägigen Kultivierung der *Cornea* zeigten sich morphologische Veränderungen in der Zellgestalt des Endothels. Diese waren im Vergleich zu nativ fixierten besonders durch eine Quellung der Zellen charakterisiert, wobei grundsätzlich die natürliche hexagonale Gestalt der Zellen erhalten blieb. Da wie oben beschrieben eventuelle Schäden am Endothel erst nach einigen Tagen zu erkennen sind, wird aus dem Vergleich dieser beiden Kontrollgruppen die Notwendigkeit der *ex vivo* Kultivierung von Spenderhornhäuten in der klinischen Anwendung verdeutlicht.

Die ersten erfolgreichen Transplantationen von kryokonservierten Hornhäuten erfolgte in den 1960er Jahren mit den unabhängig entwickelten Methoden von Capella et al. (1965) und O'Neill et al. (1967) in den USA und in Großbritannien. Es konnte gezeigt werden, dass trotz entstandener Schäden am Endothel ein Überleben der Transplantate möglich war [Schultz et al.,

1985; Van Horn & Schultz, 1974]. Daher untersuchten Wissenschaftler im Folgenden den Mechanismus der Kryokonservierung der *Cornea* und die dabei entstehenden Schäden am Endothel. Diese Studien brachten viele neue Erkenntnisse, allerdings ist der Mechanismus der Endothelverletzung während der Kryokonservierung noch nicht genau geklärt [Armitage, 2009]. Wie einleitend erwähnt, verhindert das Standardkryokonservierungsmedium Dimethylsulfoxid mit fetalem Kälber Serum (DMSO+FKS) die intrazelluläre Eiskristallbildung und osmotische Dehydrierung der Zellen. Jedoch wirkt DMSO bereits in geringen Konzentrationen zytotoxisch und führt daher zu Zellschäden beim Einfrierprozess [Potrykus & Suhr, 2011]. Alternativ zum Standardmedium DMSO+FKS wurden daher andere nicht zytotoxische Kryokonservierungsmedien getestet [Armitage, 2009]. Dabei stellt sich die Frage welchen Grad an Gefrierschäden am Endothel durch Einsatz dieser Kryoadditiva entsteht [Taylor, 1986].

In der vorliegenden Arbeit erwiesen sich einerseits die Kombination aus Hydroxyethylzellulose und Hydroxyethylstärke (HEZ+HES) und andererseits die Substanz Polyvinylpyrrolidon (PVP) am besten für die Kryokonservierung der *porcinen Corneae*. Es zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zum Überleben von Endothelzellen nach der Kryokonservierung in diesen Medien.

Die kryoprotektive Wirkung von HES beruht auf der Hygroskopie – der Fähigkeit Wassermoleküle zu absorbieren (0,5 g Wasser pro 1 g HES) und damit die Viskosität des Mediums zu erhöhen [Körber & Scheiwe, 1980]. Dabei spielt vor allem die Verteilung der HES-Moleküle in der Lösung eine wichtige Rolle. Zu viel HES in unmittelbarer Nähe der Zelle verlangsamt den Wasserfluss zu stark, woraus eine letal wirkende intrazelluläre Eiskristallbildung resultiert [Takahashi et al., 1988]. In der Literatur sind häufig Kryokonservierungsversuche mit HES in Kombination mit anderen Kryoprotektanzien beschrieben. So wird es meist zur Kryokonservierung von roten und weißen Blutkörperchen [Kim et al., 2004; Lionetti et al., 1975; Lionetti et al., 1978] sowie von Knochenmarks- und Blutstammzellen [Luo et al., 1994; Sudo et al., 2005] verwendet. Für die Kryokonservierung von Keratinozyten erzeugte eine 10 %ige HES-Lösung die höchste Überlebensrate und Stoffwechselaktivität der Zellen [Pasch et al., 1999]. Weiterhin wurde HES als Kryoprotektanz für Organe, wie Leber und Luftröhren getestet [Mabrut et al., 2001; Neveux et al., 1997]. Dem gegenüber ist die Verwendung von Hydroxyethylzellulose als Kryoprotektanz in der Literatur nicht beschrieben. Die industrielle Anwendung von HEZ als Schutzkolloid, Bindemittel und Verdickungsmittel sowie seine chemische Konfiguration deuten auf eine gute Affinität zu Wasser hin [Laschet, 2002]. Des Weiteren wird HEZ in der Kosmetik und Pharmazie z.B. als Tränenflüssigkeitsersatz und Wundgel eingesetzt. Durch die Kombination aus beiden Substanzen wird ein synergetischer Effekt erzeugt. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde in Vorversuchen der Arbeitsgruppe die



Zusammenstellung von HEZ+HES bereits als Kryokonservierungsmedium für Zellen getestet [Müller, 2012]. Der synergetische Effekt reduziert im Allgemeinen die Quellung der Zellen durch die starke Absorptionsfähigkeit von Wasser [Schmalz, 2009]. Daher schien die Testung dieses Kryokonservierungsmediums an der *porcinen Corneae* plausibel. Obwohl in der vorliegenden Arbeit ein leichtes Quellen des Stromas beobachtet wurde, beeinträchtigte das die Schutzwirkung für das vitalitätsbestimmende Endothel nur gering, da in den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen eine weitgehend intakte Zellschicht zu erkennen war. Bei in HEZ+HES kryokonservierten Hornhäuten waren neben Riesenzellen hexagonale Endothelzellen zu beobachten, wobei die Kryokonservierung mit PVP ein Verlust der hexagonalen Form verursachte. Trotz dieser Erkenntnis konnte in dieser Arbeit ein statistischer Zusammenhang zum Überleben von Endothelzellen nach der Kryokonservierung in PVP hergestellt werden.

Bedingt durch den Einsatz als kolloid osmotisch wirksame Substanz und seiner geringen Toxizität kann PVP vor hypotonischem Stress während des Einfrierprozesses schützen [Madden, 1988]. Die Untersuchung von PVP allein und in Kombination mit anderen Kryoprotektanzien wurde bereits an einigen Zellen und Geweben durchgeführt. *Smillie et al.* (1981) berichteten von der erfolgreichen Konservierung von Blutplättchen in einer 5 %igen PVP-Lösung. Des Weiteren wurde PVP bereits bei der Kryokonservierung von Maus-, Rind-, Schaf- und Schweine-Embryonen getestet [Dumoulin et al., 1994; Kobayashi et al., 1998; Leibo & Oda, 1993; Saha et al., 1996; Songsasen et al., 1995]. Außerdem untersuchten *Madden* (1988) und *Madden et al.* (1993) die Anwendung von PVP in Kombination mit Dimethylsulfoxid (3 M DMSO + 40 % PVP) als Kryokonservierungsmedium für Kaninchen *Corneae*. Diese Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass die Zellvitalität und Ablösung der Endothelzellschicht in Abhängigkeit von der Kühlrate beeinflusst wird und dass mehr intakte Zellen in Anwesenheit von PVP zu beobachten waren. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine erhöhte Anzahl von intakten Zellen bei in PVP kryokonservierten Hornhäuten im Vergleich zu anderen Konservierungsmedien bestätigt werden. Zudem beschrieben *Madden et al.* (1993) in Zusammenhang mit PVP eine Quellung der Endothelzellen nach der Kryokonservierung, welches in der vorliegenden Arbeit ebenfalls zu beobachten war. Daraus konnte jedoch nur eine geringe Beeinträchtigung der Schutzwirkung für die Endothelzellschicht beschrieben werden, da die rasterelektronenmikroskopische Analyse ein durch Riesenzellen geschlossenes Endothel ergab. Schlussendlich erwies sich PVP aufgrund seiner osmotischen Wirksamkeit als geeignetes Kryokonservierungsmedium für *porcine* Hornhäute.

Neben HEZ+HES und PVP wurde in der vorliegenden Arbeit die kryoprotektive Schutzwirkung der Kombinationen aus Dimethylsulfoxid und fetalem Kälber Serum (DMSO+FKS), 1,2-Propandiol und Methylzellulose (PD+MZ), 1,2-Ethandiol und Hydroxyethylstärke

(ED+HES), Trehalose und Polyvinylpyrrolidon (TRE+PVP) und Trehalose allein (TRE) getestet. Jedoch konnten bei diesen fünf Medien anhand lichtmikroskopischer und rasterelektronenmikroskopischer Analyse die Ablösung der Epithel- und Endothelschicht beobachtet werden. Auch der Quellungszustand des Stromas der in PD+MZ, ED+HES, TRE+PVP und TRE konservierten Hornhäute wies auf eine geringe kryoprotektive Wirkung dieser Medien hin. Einzig allein die Kombination von DMSO+FKS verhinderte eine Quellung des Stromas, jedoch nicht die Ablösung der Endothelzellschicht. Es konnte demnach kein signifikanter Zusammenhang zum Überleben von Endothelzellen nach der Kryokonservierung in diesen fünf Medien gezeigt werden. Bei den Kombinationen DMSO+FKS, PD+MZ und ED+HES spielen vor allem die unterschiedlichen Eigenschaften der Substanzen eine Rolle. So gehören DMSO, PD und ED zu den penetrierenden Kryoprotektanzen und ermöglichen daher die Wasserbindung in der Zelle sowie die Verhinderung der intrazellulären Eiskristallbildung [Armitage, 2009; Pegg, 2007; Potrykus & Suhr, 2011]. FKS, MZ und HES ergänzen diesen Effekt durch ihre kolloid osmotische Wirksamkeit und verringern dadurch die Dehydrierung der Zelle [Stolzing et al., 2012; Toyosawa, 2007]. Auch TRE ist ein nicht penetrierendes osmotisch wirksames Kryoprotektanz und wird zudem von Tieren und Pflanzen als natürliches Schutzmittel verwendet [Kang & Shen, 2012; Schill, 2010]. In der Literatur wurde bereits die Kryokonservierung von Hornhäuten unter Verwendung von DMSO, PD, ED, HES und TRE allein und in Kombination mit anderen Kryoprotektanzen beschrieben [Fan et al., 2009; Neronov et al., 2005; Routledge & Armitage, 2003].

Rodrigues et al. (2008), Tijssen et al (2008) und Yeh et al. (2008) stellten fest, dass die meisten Zellen keine hohen Konzentrationen von DMSO tolerieren. Allerdings wurde von Cabrita et al. (2003) und Ding et al. (2007) berichtet, dass DMSO ein gutes Kryoprotektanz für Embryonen darstellt. Hingegen beobachteten Wusteman et al. (1999) eine starke Temperaturabhängigkeit der Toxizität von DMSO gegenüber *porcinen* Hornhäuten. Daraus lässt sich schließen, dass die Toxizität nicht nur von den chemischen Eigenschaften, sondern auch von den Zellarten und Organismen abhängig ist. Verdeutlicht wird dieser Effekt durch die Untersuchungen von Wusteman et al. (1997, 1999). Hier konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu Kaninchen-Hornhäuten die Kryokonservierung in 15-20 % DMSO endotheliale Schäden an der *porcinen* Cornea induziert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten große Zellschäden am Endothel der in DMSO+FKS kryokonservierten Hornhäute festgestellt werden, woraus sich eine höhere Empfindlichkeit von *porcinen* Gewebe gegenüber DMSO ableiten lässt. Jedoch wird DMSO aufgrund seiner verbreiteten Funktionalität für verschiedene Zelltypen und Gewebe weiterhin am häufigsten in der Forschung als Kryokonservierungsmedium eingesetzt. [Wusteman et al., 1997]. Wobei es meist in Kombination einer osmotisch wirksamen Substanz, wie FKS, HES

oder verschiedenen Zuckern verwendet wird [Edelhauser et al., 1970; Naaldjik et al., 2012; Younis et al. 2009].

Die Anwendung von PD allein und in Kombination mit anderen Substanzen wurde bereits von drei Arbeitsgruppen um *Rich & Armitage* (1990, 1991), *Buorne et al.* (1994), *Routledge & Armitage* (2003) und *Neronov et al.* (2005) untersucht. So erforschten die Arbeitsgruppen um *Rich & Armitage* (1990, 1991) die Toleranz der *Cornea* gegenüber der Substanz 1,2-Propandiol allein und in Kombination mit Glycerin. *Routledge & Armitage* (2003) untersuchten die Kryokonservierung von Kaninchen-Hornhäuten in 10 % PD und konnten zeigen, dass langsames Abkühlen und anschließend schnelles Erwärmen die Morphologie und Funktion der Endothelschicht erhält. *Buorne et al.* (1994) stellten fest, dass *corneale* Endothelzellen eine hohe Verträglichkeit gegenüber PD besitzen, allerdings zeigten die getesteten Konzentrationen keinen ausreichenden kryoprotektiven Schutz für diese Zellen. Bei der Untersuchung der Kryokonservierung von *humanen* Hornhäuten in 5-10 % DMSO oder 5-10 % PD beobachteten *Neronov et al.* (2005), dass PD im Vergleich zu DMSO starke Schäden am Endothel verursacht und die *Cornea* daher nicht zur Transplantation geeignet war. Die Verwendung von MZ als Kryoprotektanz wurde bisher nicht an der *Cornea* getestet. Jedoch beschrieben *Dalimata & Graham* (1997) und *Phillips et al.* (1996) eine positive Wirkung auf die Fruchtbarkeit von kryokonservierten Kaninchen- und Hühner-Spermatozoen unter Verwendung von MZ in Kombination einer penetrierenden Substanz. Des Weiteren wurde von *Ohno et al.* (1988) und *Merten et al.* (1995) ein vitalitätssteigernder Effekt von MZ nach der Kryokonservierung für verschiedene Zellarten beobachtet. Die Kombination aus PD und MZ würde sowohl die intrazelluläre Eiskristallbildung als auch die Dehydratation der Zellen verhindern. Daher schien eine Testung an verschiedenen Zellarten und Geweben plausibel. In Vorversuchen der Arbeitsgruppe führte die Kombination für Gingivafibrozyten, Keratinozyten und Endothelzellen zu einer guten Revitalisierung nach der Kryokonservierung [Müller, 2012]. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit kein kryoprotektiver Effekt in Zusammenhang mit PD und MZ für *porcines* Gewebe ermittelt werden. Wobei der von *Wusteman et al.* (1999) beobachtete organismenabhängige Effekt für DMSO eventuell auf die Wirkung von PD übertragbar und genauer zu untersuchen ist.

1,2-Ethandiol wird in der Literatur meist als Kryokonservierungsmedium für Eizellen, Spermien und Embryonen verschiedener Spezies beschrieben [Chi et al., 2002; Emililani et al., 2000; Mantovania et al., 2002; Salehnia, 2002]. Des Weiteren untersuchten *Pasch et al.* (1999) und *Fan et al.* (2009) die Kryokonservierung von Keratinozyten und *cornealen* Endothelzellen. Dabei konnten *Pasch et al.* (1999) nur eine geringe Vitalität von Keratinozyten nach der Kryokonservierung in 10 % ED+FKS feststellen. *Fan et al.* (2009) untersuchten neben DMSO

und PD als penetrierende Protektanzen die Substanz ED. Obwohl sie für alle getesteten penetrierend wirksamen Substanzen einen toxischen Effekt für *corneale* Endothelzellen feststellten, erwies sich ED als am wenigsten schädlich. Die Testung von ED in Kombination von Zuckern und Polymeren ergab schlussendlich eine besser wirkende Alternative zu DMSO+FKS. Aufgrund der Ergebnisse von *Fan et al.* (2009) wurde in Vorversuchen der Arbeitsgruppe die Kombination von ED+HES getestet. Hier konnten für Gingivafibrozyten, Keratinozyten und Endothelzellen gute Revitalisierungsergebnisse ermittelt werden [Müller, 2012]. Trotz der Kombinierung von membrangängigen und osmotisch wirksamen Substanzen konnte ED+HES in der vorliegenden Arbeit keine Schutzwirkung für *porcine* Hornhäute entfalten. Auch im Fall von ED könnte der organismenspezifische Wirkeffekt, der von *Wusteman et al.* (1999) für DMSO beobachtet wurde, Einfluss haben.

Trehalose ist ein natürlich vorkommendes Disaccharid, welches weit verbreitet in vielen Arten von Pflanzen und Tieren vorkommt. Dort schützt und stabilisiert es zelluläre Membranen und Proteine gegen Beschädigung und Denaturierung infolge vor Austrocknung [Luyckx & Baudouin, 2011]. Auch vom erfolgreichen Einsatz der Trehalose in der Therapie gegen trockene Augen wird berichtet. Obwohl der Schutzmechanismus von Trehalose allein nicht vollständig geklärt ist, gibt es eine mögliche Hypothese. Es wird vermutet, dass Trehalose die Struktur des Wassers verändert und somit die verbleibenden Wassermoleküle um die biologischen Strukturen anordnet [Teramoto et al., 2008]. Aufgrund dieser Eigenschaften untersuchten Wissenschaftler den Einsatz von Trehalose als Kryoprotektanz für verschiedene Zellen und Gewebe [Beattie et al., 1997; Katenz et al., 2007; Wolkers et al., 2001]. So erforschten *Halberstadt et al.* (1999) und *Wusteman et al.* (2007) die Gefrierkonservierung von Kaninchen-Hornhäuten und *Fan et al.* (2008) die Konservierung von *cornealen* Endothelzellen in Verbindung mit Trehalose. In allen drei Studien konnte ein schützender Effekt von Trehalose bestätigt werden. Obwohl *Wusteman et al.* (2007) eine Quellung der *Cornea* nach der Kryokonservierung beobachteten, hatte dies keinen Einfluss auf die Vitalität der *Cornea*. In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Quellung des Stromas bei in TRE kryokonservierten Hornhäuten festgestellt werden, wobei dies den Zustand der Endothelzellschicht beeinflusste. Die Studien von *Wusteman et al.* (2007) und *Fan et al.* (2008) untersuchten Kombinationen von Trehalose und 1,2-Propandiol, wohingegen andere Autoren berichten, dass durch Zugabe von DMSO zu Trehalose eine Verbesserung der kryoprotektiven Wirkung erzielt werden konnte [Bakhach, 2009; Kang & Shen, 2012]. Des Weiteren konnte mehrfach gezeigt werden, dass die Schutzwirkung von Trehalose am effektivsten ist, wenn es auf beiden Seiten der Membran wirkt [Crowe et al., 2000; Eroglu et al., 2000]. Daher wird davon ausgegangen, dass die penetrierenden Wirkung von DMSO und PD für die Erhöhung der protektiven Wirkung von Trehalose verantwortlich ist, da dieses das Eindringen von Trehalose in Zellen ermöglicht

[Erdag et al., 2002]. Trotz der in der Literatur beschriebenen positiven Effekte von Trehalose konnte in der vorliegenden Arbeit keine Schutzwirkung für *porcine* Hornhäute ermittelt werden. Wobei eine Untersuchung von Trehalose in Kombination eines penetrierenden Kryoprotektanz sinnvoll wäre.

Entgegen des positiven Effekts für das Überleben der Endothelzellen von PVP konnte in Kombination mit TRE keine kryoprotektive Wirkung für *porcine* Hornhäute festgestellt werden. Dieser Effekt könnte in der rein osmotischen Wirksamkeit von Trehalose liegen, da wie oben beschrieben, die kryoprotektive Wirkung von Trehalose in Kombination eines penetrierenden Wirkstoffs gesteigert werden kann [Crowe et al., 2000; Eroglu et al., 2000].

Obwohl in der Literatur erfolgreiche Kryokonservierungen der *Cornea* in Zusammenhang mit DMSO, PD, ED und TRE beschrieben wurden, zeigten die in der vorliegenden Arbeit getesteten Medien keine kryoprotektive Wirkung. Gründe hierfür könnten falsch gewählte Substanzkonzentrationen oder Zusammensetzung des Basismediums sein. In der Literatur wurde diesbezüglich häufig die Pufferlösung CPTES<sup>3</sup> als Basismedium für die Hornhaut Kryokonservierung beschrieben [Madden et al., 1993; Taylor & Hunt, 1985; Wusteman et al., 1997]. Des Weiteren zeigte auch die Evaluation verschiedener Kühlraten von 0,03 °C/min, 0,1 °C/min, 1 °C/min, 5 °C/min oder 20 °C/min Einfluss auf den kryoprotektiven Effekt [Madden et al., 1993; Neronov et al., 2005]. Wie von Wusteman et al. (1997) und Wusteman et al. (1999) für Kaninchen und Schweine-Hornhäute beschrieben, konnte ein Zusammenhang zwischen der Sensibilität für mechanische Einflüsse verschiedener *Cornea*-Gewebe und der Wirkung auf den Kryokonservierungsprozess festgestellt werden. Auch

Neben den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Kryokonservierungsmedien für Hornhäute wurden in der Literatur weitere Substanzen, wie Glycerin, Acetamid, Chondroitinsulfat, Dextran, Ficoll, Fructose, Glucose, etc. allein und in Kombination untersucht [Fan et al., 2009; Hagenah & Böhnke, 1993; Halberstadt et al., 2001; Lehr et al., 1992; Neronov et al., 2005]. Dabei wirken Glycerin und Acetamid penetrierend und Chondroitinsulfat, Dextran, Ficoll, Fructose und Glucose kolloid osmotisch. Aus vorhergehend genannten Gründen der Konzentrationsabhängigkeit, Zellabhängigkeit und vor allem Organismenabhängigkeit der Kryokonservierung von Hornhäuten und anderen Geweben ist diese im Moment noch kein Stand der Technik. Ein weiterer Grund ist die anfangs erwähnte Herausforderung bei der Durchdringung der Kryoprotektanzen des Gewebes.

Die Deutsche Gesellschaft für Gewebetransplantation vermittelte 2011 deutlich mehr Transplantate, so wurden 2.017 Augenhornhäute, 929 Amnionmembranpräparate, 71 Herz-

---

<sup>3</sup> CPTES - *corneal-potassium-TES* (impermeabler anionischer pH-Puffer)

klappen und 126 Gefäße transplantiert. Dies entspricht einer Steigerung von etwa 22 % im Vergleich zum Vorjahr [DGFG, 2012 b]. Aufgrund des erhöhten Bedarfs an Transplantaten von Hornhaut, Blutgefäßen, Knochen und Haut wird an der Kryokonservierung von Geweben geforscht. Mehr denn je rückt die Kryokonservierung von biologischen Geweben und Organen, mit dem Ziel der Erhaltung der Organe vom lebenden Spender bis hin zum Empfänger, in den Mittelpunkt der Forschung [Bakhach, 2009]. Nichts desto trotz reagieren verschiedene Zellen und Gewebe unterschiedlich auf den Einfrierprozess. Dabei hängt eine optimale Konservierung oft von verschiedenen Parametern, wie Kühlgeschwindigkeit, Salzkonzentration und eingesetzten Kryoprotektanzien ab. Diese müssen einerseits die Bildung von intrazellulären Eiskristallen und andererseits die zelluläre Dehydratisierung vermeiden, welche letal für Zellen wirken können.

Dermal-epidermale Transplantate sind einfach zu untersuchen, jedoch begrenzt, insbesondere im Hinblick auf inhomogene Diffusion der Kryoprotektanzien über die gesamte Dicke des Transplantats. So zeigten *Zieger et al.* (1997), dass die Konzentration der Kryoprotektanzien innerhalb des Transplantats die Grenze von 44 % bis 69 % der Konzentration im umgebenden Medium nicht überstiegen. Viele experimentelle Studien betreffend der Kryokonservierung von Haut untersuchen Transplantate *bovinen* und *humanen* Ursprungs [Erdag et al., 2002; Villalba et al., 1995; Villalba et al., 1996; Zieger et al., 1996; Zieger et al., 1997]. *Villalba et al.* (1996) beschrieben den Einsatz von 1,2-Propandiol, wobei Konzentrationen von 10 % bis 20 % PD und eine niedrige Abkühlrate das beste Überleben von Hautgewebe ermöglichten. Die Verwendung von 2 M Glycerin mit einer schnellen Abkühlrate erlaubte *Zieger et al.* (1997) den optimalen Schutz von dermal-epidermalen Strukturen. Des Weiteren zeigte der Einsatz von Trehalose in Kombination mit DMSO im Vergleich zu DMSO allein eine gesteigerte Wirksamkeit bei der Kryokonservierung von *humaner fötaler* Haut [Erdag et al., 2002].

Neben der Kryokonservierung von Hautgewebe wurden in der Literatur unter anderem die Gefrierkonservierung von Blutgefäßen, Knochengewebe, Knochenhaut und Knorpel beschrieben. Blutgefäße wurden weitgehend mit dem Zweck der Bestimmung der optimalen Parameter der Erhaltung und Verbesserung des Überlebens der endothelialen Zellen untersucht. So wurde anfänglich DMSO zu Kryokonservierung von Kaninchen Halsschlagadern verwendet [Pegg et al., 1997]. Auch *Pascual et al.* (2004) konnte mit DMSO und einer Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/min 89 % Überleben von arteriellen Segmenten erzeugen. In Gewebebanken, ist es üblich, lange Knochensegmente für die Rekonstruktion von großen Knochenverlusten, insbesondere für komplette Hüftprothesen einzufrieren [Poitout, 1996]. Auch in DMSO kryokonservierte Knochenhaut kann dank seiner osteogenen Kapazität verwendet werden, um Bereiche in beschädigten Gelenken und Knochen zu rekonstruieren

[Kreder et al., 1993]. Aufgrund der bis heute fehlenden Möglichkeit Läsionen des Knorpels zu heilen, versuchten zahlreiche Studien ein Kryokonservierungsprotokoll für Knorpel oder Knorpelzellen zu entwickeln, jedoch mit mäßigen Erfolg [Muldrew et al., 2001; Sammarco et al., 1997].

Defekte im Bereich der Mundschleimhaut werden im Allgemeinen mit Haut- oder Schleimhauttransplantaten gedeckt. Jedoch ist es gerade bei Tumorpatienten, aufgrund der Behandlung mit Zytostatika und therapeutischer Bestrahlung sowie begrenzter Verfügbarkeit, meist nicht möglich autologe Mundschleimhaut zu transplantieren. Daher werden Mundschleimhautbiopsien von entsprechenden Patienten mittels Tissue Engineering vermehrt. Die gezüchteten Gewebeäquivalente sollen zur zeitlichen Entkopplung bis zum jeweiligen Zeitpunkt der Transplantation kryokonserviert gelagert werden. Da im klinischen Zusammenhang das Einfrieren von Mundschleimhaut nicht erforderlich ist, wurden die kryoprotektiven Eigenschaften der Substanzen an der *Cornea* getestet. Dieses Gewebe bietet im Hinblick auf die Durchdringung der Kryoprotektanzien ein kleines und standardisiertes Gewebe. Des Weiteren wurden Methoden zur Kryokonservierung für Hornhäute mit dem Hintergrund verbessert, dass die *Cornea* aufgrund ihrer Morphologie ein wertvolles Modell für andere Gewebe und tissue-engineerte Konstrukte liefert [Armitage, 2009]. Infolgedessen wurde in der vorliegenden Arbeit die kryoprotektive Wirkung verschiedener Substanzen für Mundschleimhautkonstrukte getestet. Dabei revitalisierten die in den Kombinationen ED+HES und HEZ+HES kryokonservierten Gewebeäquivalente ähnlich gut wie die in DMSO Eingefrorenen. Mit einer Proliferationsaktivität von fast 90 % der uneingefrorenen Kontrollen revitalisierten die Konstrukte nach der Kryokonservierung in PVP mit Abstand am besten. In der Kombination mit TRE wurde jedoch die hervorragende kryoprotektive Wirkung von PVP leicht gesenkt. Für beide Medien konnte ein signifikanter Zusammenhang zur Vitalität der Zellen nach der Kryokonservierung gezeigt werden.

Der früheste Beweis der schädlichen Wirkung von Dimethylsulfoxid (DMSO) während der Kryokonservierung für Gewebe wurde von *Meryman* (1966) geliefert. Daraufhin untersuchten *Fahy & Karow* (1977) Jahre später den Zusammenhang eingesetzter Konzentration und daraus entstehende Zellschädigungen am Gewebe. Gezeigt werden konnte, je höher die Konzentration von DMSO gewählt wurde, umso mehr Schäden am Gewebe wurden hervorgerufen. Auch *Kahn* (1978), *Fishbein & Winkert* (1979) und *Fahy* (1980) kamen zu ähnlichen Ergebnissen für verschiedene Gewebetypen. Trotz dieser Erkenntnisse wird DMSO immer noch standardmäßig als Kryokonservierungsmedium für Gewebe und Zellen verwendet, da es die Eiskristallbildung reduziert [Potrykus & Suhr, 2011]. *Castagnoli et al.* (2003) untersuchte die Vitalität von frischer und kryokonservierter Haut unter Verwendung eines MTT-Assays. Im Vergleich zu

frisch kultivierter Haut konnte eine Zellvitalität von ca. 50 % für in DMSO eingefrorenen Hauttransplantate ermittelt werden. In dieser Arbeit konnte dieses Ergebnis mit einer prozentualen Revitalisierung der in DMSO und DMSO+FKS kryokonservierten Gewebeäquivalente von unter 50 % bestätigt werden. Weiter untersuchte *Costa et al.* (2012) die Kryokonservierung von tissue-engineerten Konstrukten und gelangte zu einer ähnlichen Aussage. Im Vergleich zur Kryokonservierung des Hornhautgewebes in DMSO+FKS konnte für Mundschleimhautkonstrukte eine kryokonservierende Wirkung dieses Mediums gezeigt werden.

Die Verwendung von 1,2-Ethandiol als Kryoprotektanz wurde von *Fujita et al.* (2000), *Bolívar-Flores & Kuri-Harcuch* (1999) und *Silvestre et al.* (2003) für *humanes* und *animales* Hautgewebe getestet. So ermöglichte die Kombination aus 40 % ED, 30 % Ficoll und Saccharose *Fujita et al.* (2000) eine erfolgreiche Kryokonservierung *humaner* Haut mit 87,4 % vitalen Zellen. Des Weiteren konnten in Vorversuchen der Arbeitsgruppe für verschiedene Mundschleimhautzellarten gute Revitalisierungsergebnisse nach der Kryokonservierung in ED+HES erzeugt werden [Müller, 2012]. Allerdings zeigte der Vergleich von in ED+HES konservierten Gewebeäquivalenten zu uneingefrorenen Konstrukten in der vorliegenden Arbeit, dass nur etwa 50 % der Vitalität erreicht wurde. Damit ermöglichte diese Kombination eine ähnliche Schutzwirkung wie DMSO+FKS.

Ähnliche Revitalisierung der kryokonservierten Konstrukte konnten in der vorliegenden Arbeit für die Kombination aus HEZ+HES ermittelt werden. Wie bereits erwähnt, wird HES allein oder in Kombination vor allem zur Konservierung von verschiedenen Zellarten verwendet. So berichteten *Kim et al.* (2004), *Lionetti et al.* (1975), *Luo et al.* (1994), *Sudo et al.* (2005) und *Müller* (2012) von der Gefrierkonservierung von roten und weißen Blutkörperchen, Knochenmarks- und Blutstammzellen, Gingivafibrozyten, Keratinozyten und Endothelzellen. Von der Anwendung von Hydroxyethylzellulose als Kryoprotektanz wird in der Literatur dagegen nicht berichtet. Wobei seine industriellen Funktionen und seine chemischen Eigenschaften auf eine mögliche Schutzwirkung hindeuten. Wie in den Vorversuchen der Arbeitsgruppe [Müller, 2012], konnten in der vorliegenden Arbeit für die Kombination aus HEZ+HES eine ähnliche kryoprotektive Wirkung für Mundschleimhautkonstrukte zu DMSO+FKS ermittelt werden. Betrachtet man im Vergleich dazu die Ergebnisse aus der Kryokonservierung von der *Cornea* kann gesagt werden, dass dieses Medium in beiden Gewebe seine Schutzwirkung entfaltet. Wobei HEZ+HES im Vergleich zu den anderen untersuchten Medien für die *Cornea* sehr gut funktionierte und für die Gewebeäquivalente mittelmäßige Ergebnisse lieferte.



Demgegenüber revitalisierten die in TRE+PVP und PVP kryokonservierten Konstrukte, mit einer Proliferationsaktivität von ca. 80 % - 90 % der uneingefrorenen Kontrollen, sehr gut. Die Anwendung von Trehalose als Kryoprotektanz wurde mehrfach in der Literatur beschrieben. Einige Autoren berichten, dass sie durch Zugabe von Trehalose zu DMSO eine Verbesserung der kryoprotektiven Wirkung des Mediums erzielen konnten [Bakhach, 2009; Erdag et al., 2002; Kang & Shen, 2012]. So untersuchte *Erdag et al.* (2002) die Kryokonservierung von *fötaler humaner* Haut und stellte statistisch signifikante Unterschiede in der Membranintegrität der in Trehalose und DMSO eingefrorenen Haut im Vergleich zu in DMSO konservierter Haut fest. *Kang & Shen* (2012) beobachteten die gut erhaltenen epidermalen und dermalen Strukturen von kryokonservierten Hauttransplantaten und die Erhöhung der protektiven Wirkung von Trehalose in Kombination mit DMSO. Die penetrierende Wirkung von DMSO scheint somit für die Erhöhung der protektiven Wirkung von Trehalose verantwortlich zu sein. [Erdag et al., 2002]. In dieser Arbeit konnte jedoch keine kryoprotektive Wirkung für Mundschleimhautkonstrukte in Zusammenhang mit Trehalose nachgewiesen werden, wobei auf eine Testung der Kombination von TRE und DMSO verzichtet wurde, da DMSO nachweislich zellschädigend wirkt. Darüber hinaus beeinflusste Trehalose den stark kryoprotektiven Effekt von PVP negativ. Gründe hierfür könnten falsch gewählte Substanzkonzentrationen und fehlende Vorinkubation sein. Neben TRE+PVP konnte PVP die Vitalität der Konstrukte nach der Kryokonservierung am besten erhalten. Wie bereits beschrieben, wurde PVP als Kryokonservierungsmedium für verschiedene Zellen und Gewebe untersucht. Dabei konnten gute Ergebnisse bei der Konservierung von Blutplättchen, Embryonen und der *Cornea* erzeugt werden [Kobayashi et al., 1998; Madden et al., 1993; Smillie et al., 1981]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine sehr gute Schutzwirkung von PVP für Gewebeäquivalente bestätigt werden. Überraschender Weise zeigte die Substanz PVP sowohl für Mundschleimhautkonstrukte als auch für Hornhäute die beste kryoprotektive Wirkung.

*Umemura et al.* (2011) berichtete, das wirksame Kryoprotektanzen üblicherweise aus einer penetrierenden und einer osmotisch wirksamen Substanz bestehen. In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein signifikanter Zusammenhang zum Überleben des *Cornea*-Endothels sowie der Revitalisierung der Mundschleimhautkonstrukte in einem derartigen Medium beobachtet werden. Entgegen aller Erwartungen zeigten die Kryokonservierungsmedien HEZ+HES (10 mg/ml + 8 %) und PVP (200 mg/ml) die beste kryoprotektive Wirkung für *porcine* Hornhäute. Auch entfalteten diese rein osmotisch wirkenden Medien eine Schutzwirkung für Mundschleimhautkonstrukte, wobei fast 90 % der Vitalität von uneingefrorenen Gewebeäquivalenten nach der Kryokonservierung in TRE+PVP (0,3 M + 200 mg/ml) und PVP (200 mg/ml) erreicht wurde.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der kryoprotektiven Wirkung der Kombination aus Dimethylsulfoxid + fetalen Kälber Serum, 1,2-Propandiol + Methylzellulose, 1,2-Ethandiol + Hydroxyethylstärke, Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke und Trehalose + Polyvinylpyrrolidon für *porcine* Hornhäute und Mundschleimhautkonstrukte. Des Weiteren erfolgte die Testung der Einzelsubstanzen Polyvinylpyrrolidon und Trehalose an diesen Geweben.

Die Überprüfung der kryokonservierenden Wirkung dieser Medien wurde anhand der Revitalisierung von Hornhäuten und Gewebeäquivalenten nach dem Einfrieren und Auftauen beurteilt. Hierzu wurden *Corneae* von Schweinen entnommen, präpariert und anschließend der Kryokonservierung bzw. der Gewebekultur zugeführt. Der Zustand der Hornhäute vor und nach der Kryokonservierung wurde unter Verwendung verschiedener histologischer und morphologischer Parameter beurteilt. Dazu wurde eine rasterelektronenmikroskopische Endothelbefundung und an Paraffinschnitten eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt. Parallel dazu wurden *in vitro* Mundschleimhautkonstrukte hergestellt. Hierzu wurden Kollagenscaffolds mit drei für die *orale Mukosa* typischen Zellen besiedelt und kultiviert. Diese Gewebeäquivalente wurden nach der Kryokonservierung ebenfalls aufgetaut und rekultiviert. Die Beurteilung der Revitalisierung der Konstrukte nach der Gefrierkonservierung erfolgte mittels Proliferationsassay. Im Anschluss ließ die statistische Auswertung mittels *One Way Repeated Measures Analysis of Variance* und *Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks* signifikante Zusammenhänge zur Revitalisierung der Gewebeäquivalente sowie zum Überleben des *Cornea*-Endothels erkennen.

In der Literatur wurde die Kryokonservierung von Zellen und Geweben in Verbindung mit verschiedensten Medien beschrieben. Wobei die Lagerung von Suspensionszellen unter Verwendung von Kryobedingungen bereits Stand der Technik ist, wurden für *Cornea*- und Haut-Gewebe lediglich von erfolgreichen Kryokonservierungsversuchen in Verbindung weniger Medien, wie Dimethylsulfoxid, 1,2-Propandiol, 1,2-Ethandiol und Trehalose berichtet. Auch die Kryokonservierung von tissue-engineerten Konstrukten wurde bisher wenig untersucht. Begründet liegt das in der meist komplexen Struktur von Geweben, die das Durchdringen der kryoprotektiven Substanzen erschweren.

In der vorliegenden Arbeit erzielten die Medien Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke und Polyvinylpyrrolidon die beste kryoprotektive Wirkung für *porcine* Hornhäute, wobei ein statistisch signifikanter Zusammenhang zum Überleben der Endothelzellen nach Kryokonservierung gezeigt werden konnte. Sowohl die Wirkung von Hydroxyethylzellulose als auch

von Hydroxyethylstärke beruht auf der Hygroskopie – der Fähigkeit Wassermoleküle zu absorbieren. Die Kombination dieser beiden Substanzen reduziert im Allgemeinen die Quellung der Zellen, durch die Absorption von Wasser. Obwohl unter Einsatz von Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke eine leichte Quellung des Stromas beobachtet werden konnte, beeinträchtigte sie die Schutzwirkung für das vitalitätsbestimmende Endothel nur in geringem Maße. Ein ähnliches Ergebnis konnte bei der Konservierung von *porcinen* Hornhäuten mittels Polyvinylpyrrolidon erreicht werden. Es konnte somit bestätigt werden, dass eine Kryokonservierung von Hornhäuten mittels Polyvinylpyrrolidon erfolgreich möglich ist.

Obwohl die wirksamsten Kryokonservierungsmedien üblicherweise aus einer penetrierenden und einer osmotisch wirksamen Substanz bestehen, zeigten die Medien Dimethylsulfoxid + fetales Kälber Serum, 1,2-Propandiol + Methylzellulose und 1,2-Ethandiol + Hydroxyethylstärke keine Schutzwirkung für Hornhäute. Auch der Einsatz von Trehalose + Polyvinylpyrrolidon und Trehalose allein konnte in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Zusammenhang zum Überleben des *Cornea*-Endothels erzeugen.

Die Verbesserung der Methoden zur Kryokonservierung für Hornhäute erfolgte unter anderem mit dem Hintergrund, dass die *Cornea* aufgrund ihrer Morphologie ein wertvolles Modell für andere Gewebe und tissue-engineerte Konstrukte liefert. Im Vergleich zu uneingefrorenen Konstrukten konnte bei der Kryokonservierung in Dimethylsulfoxid + fetales Kälber Serum eine Revitalisierung von ca. 50 % erreicht werden. Ähnlich gute Revitalisierungsraten erzielten die in 1,2-Ethandiol + Hydroxyethylstärke und Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke konservierten Gewebe-äquivalente. Keine Schutzwirkung für Mundschleimhautkonstrukte konnten hingegen die Medien 1,2-Propandiol + Methylzellulose und Trehalose erzeugen. Mit einer Proliferations-aktivität von 80 % - 90 % der uneingefrorenen Kontrollen revitalisierten die Konstrukte nach der Kryokonservierung in Trehalose + Polyvinylpyrrolidon und Polyvinylpyrrolidon mit Abstand am besten. Überraschender Weise zeigte somit die Substanz Polyvinylpyrrolidon sowohl für Mundschleimhautkonstrukte als auch für Hornhäute eine sehr gute kryoprotektive Wirkung.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein optimiertes Kryokonservierungsprotokoll für *porcine* Hornhäute und *in vitro* hergestellte Mundschleimhautkonstrukte entwickelt werden. Wobei die Kryokonservierungsmedien Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke (10 mg/ml + 8 %) und Polyvinylpyrrolidon (200 mg/ml) für Hornhäute und Trehalose + Polyvinylpyrrolidon (0,3 M + 200 mg/ml) und Polyvinylpyrrolidon (200 mg/ml) für Gewebeäquivalente die beste kryoprotektive Wirkung entfalteten.

## 7 Ausblick

Die zeitliche Entkopplung von der Entnahme von Geweben bzw. Herstellung von Gewebeäquivalenten und deren Transplantation ist in der klinischen Anwendung von großer Bedeutung. Aufgrund der Herausforderung bei der Kryokonservierung von Geweben findet diese nur geringe Anwendung in Gewebebanken. Daher ist es wichtig für jeden Gewebetyp ein optimales Kryokonservierungsprotokoll zu entwickeln.

In der vorliegenden Arbeit konnte im Zusammenhang mit den osmotisch wirksamen Kryoprotektanzien Hydroxyethylzellulose + Hydroxyethylstärke und Polyvinylpyrrolidon ein Kryokonservierungsprotokoll für Mundschleimhautkonstrukte und *porcine* Hornhäute etabliert werden. Für die Optimierung der Kryokonservierung dieser Gewebetypen sollten in weiterführenden Experimenten zusätzliche Kombinationen dieser Medien getestet werden. In der Literatur wurde unter anderem die erfolgreiche Kryokonservierung von Kaninchen-Hornhäuten in Polyvinylpyrrolidon mit Dimethylsulfoxid beschrieben. Daher sollten Untersuchungen von Polyvinylpyrrolidon in Kombination penetrierender Kryoprotektanzien, wie 1,2-Ethandiol und 1,2-Propandiol, durchgeführt werden, um die bereits gute Schutzwirkung von Polyvinylpyrrolidon für Hornhäute und Mundschleimhautkonstrukte weiter zu verbessern. Obwohl Trehalose in der vorliegenden Arbeit wenig kryoprotektive Wirkung zeigte, konnte in der Literatur eine Schutzwirkung von Trehalose in Kombination penetrierender Substanzen beschrieben werden. Aus diesem Grund sollten Analysen von Trehalose in Kombination mit 1,2-Ethandiol und 1,2-Propandiol in Betracht gezogen werden.

Weiterhin wurde mehrfach ein Zusammenhang zwischen der Abkühlungsrate und entstehenden Schäden an den Zellen und Geweben nach der Kryokonservierung beschrieben. Diesbezüglich sollten in anschließenden Experimenten verschiedene Kühlraten, von 0,1 °C/min bis hin zu 20 °C/min, für die Medien und Gewebe untersucht werden. Des Weiteren ist eine Untersuchung des Einflusses von Vorinkubationszeiten auf die Vitalität der Gewebe nach der Kryokonservierung interessant.

Da in der vorliegenden Arbeit die kryoprotektive Wirkung verschiedener Substanzen für Mundschleimhautkonstrukte und *porcine* Hornhäute untersucht wurde, könnten weiterführende Studien auch andere Gewebetypen einschließen.

## Literaturverzeichnis

- Albon, J;** Tullo, A. B.; Aktar, S. und Boulton, M. E. (2000): *Apoptosis in the Endothelium of Human Corneas for Transplantation*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 41(10): 2887-2893
- Armitage, J. W.** (2008): *Developments in Corneal Preservation*. Essentials in Ophthalmology, Chapter 6, pp.101-114
- Armitage, J. W.** (2009): *Cryopreservation for corneal storage*. Dev Ophthalmol. 43:63-69
- Bakhach, J.** (2009): *The cryopreservation of composite tissues: Principles and recent advancement on cryopreservation of different type of tissues*. Organogenesis 5(3):119-126
- Barraquer, J.** und Rutllan, J. (1991): *Mikrochirurgie der Kornea - Ein Atlas und Textbuch*. Enke-Verlag
- Baumhoer, D.;** Steinbrück, I. und Götz, W. (2003): *Kurzlehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag, 2. Auflage
- Beattie, G. M.;** Crowe, J. H.; Lopez, A. D.; Cirulli, V.; Ricordi, C. und Hayek, A. (1997): *Trehalose: A Cryoprotectant That Enhances Recovery and Preserves Function of Human Pancreatic Islets After Long-Term Storage*. Diabetes March 46(3):519-523
- Beckmann, I.** (2011): *Krebs im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich – Antworten, Hilfen, Perspektiven*. Deutsche Krebshilfe e.V. Bonn, ISSN 0946-4816
- Bolívar-Flores, Y. J.** und Kuri-Harcuch, W (1999): *Frozen Allogeneic Human Epidermal Cultured Sheets for the Cure of Complicated Leg Ulcers*. Dermatol Surg 25:8:610-617
- Bork, K.;** Burgdorf, W. und Hoede, N. (2008): *Mundschleimhaut- und Lippenkrankheiten – Klinik, Diagnostik und Therapien*. Schattauer Verlag, 3. Auflage
- Buorne, W. M.;** Shearer, D. R. und Nelson, N. R. (1994): *Human corneal endothelial tolerance to glycerol, dimethylsulfoxide, 1,2-propanediol und 2,3-butanediol*. Cryobiology 31:1-9
- Böck, P.** (1989): *Romeis – Mikroskopische Technik*. Urban und Schwarzenberg, 17. Auflage
- Brockbank, K. G. M.** (2002): *Stabilization of Tissue-Engineered Products for Transportation and Extended Shelf-Life*. Ann. N.Y. Acad. Sci. 961:265-267
- Cabrita, E.;** Robles, V.; Chereguini, O.; Wallace, J. C. und Herráez, M. P. (2003): *Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos*. Cryobiology 47:204-213
- Capella, J. A.;** Kaufman, H. E. und Robbins, J. E. (1965): *Preservation of viable corneal tissue*. Cryobiology 2:116-121
- Capella, J. A.;** Kaufmann, H. E. und Polack, F. M. (1972): *Prognosis of keratoplasty in phakic and aphakic patients and use of cryopreserved tissue*. Trans Am Ophthapol Soc 76:1275-1285
- Castagnoli, C.;** Alotto, D.; Cambieri, I.; Casimiri, R.; Aluffi, M.; Stella, M.; Alasia, S. T. und Magliacani, G. (2003): *Evaluation of donor skin viability: fresh and cryopreserved skin using tetrazolium salt assay*. Burns 29:759-767
- Chi, H.;** Koo, J.; Kim, M.; Joo, J.; Chang, S. und Chung, K. (2002): *Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing*. Hum. Reprod. 17(8):2146-2151

- Costa, P. F.;** Dias, A. F.; Reis, R. L. und Gomes, M. E. (2012): *Cryopreservation of Cell/Scaffold Tissue-Engineered Constructs*. Tissue Engineering Part C: Methods, July
- Crowe, J. H.;** Crowe, L. M.; Oliver, A. E.; Tsvetkova, N.; Wolkers, W. und Tablin F. (2000): *The trehalose myth revisited: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state*. Cryobiology 43:89
- Cunningham, W.J.;** Moffatt, S. L.; Brookes, N. H.; Twohill, H. C.; Pendergrast, D. G. C.; Stewart, J. M. und McGhee, C. N. J. (2012): *The New Zealand National Eye Bank Study: Trends in the Acquisition and Storage of Corneal Tissue over the Decade 2000 to 2009*. Cornea 31(5): 538-545
- Dalimata, A. M.** und Graham, J. K. (1997): *Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with Trehalose and methyl cellulose*. Thenogenology 48:831-41
- DGFG** (2012 a): *Gewebe – Augenhornhaut*. Zugriff: 15/08/2012
- DGFG** (2012 b): *Presse-Meldung*. Zugriff: 22/08/2012
- Diecke, F. P.;** Sanchez, J. M.; Kuang, K. und Fischbarg, J. (2004): *Immunocytochemical localization of Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporters and carbonic anhydrase dependence of fluid transport in corneal endothelial cells*. J Physiol Cell Physiol. 286(6):1434-1442
- Ding, F. H.;** Xiao, Z. Z. und Li, J. (2007): *Preliminary studies on the vitrification of red sea bream embryos*. Theriogenology 68:702-708
- Dumoulin, J. C.;** Bergers-Janssen, J. M.; Pieters, M. H.; Enginsu, M. E.; Geraedts, J. P. und Evers, J. L. (1994): *The protective effects of polymers in the cryopreservation of human and mouse zonae pellucidae and embryos*. Fertil. Steril. 62:793-798
- Edelhauser, H. F.;** Gallun A. B.; Van Horn, D. L. und Schultz, R. O. (1970): *Uptake and removal of Dimethyl sulfoxide in rabbit and human corneas during cryopreservation*. Cryobiology 8:104-107
- Emililani, S.;** Van den Bergh, M.; Vannin, A.; Biramane, J. und Englert, Y. (2000): *Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycerol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts*. Hum. Reprod. 15(4):905-910
- Erdag, G.;** Eroglu, A.; Morgan, J. R. und Toner, M. (2002): *Cryopreservation of fetal skin is improved by extracellular Trehalose*. Cryobiology 44:218-228
- Eroglu, A.;** Russo, M. J.; Bieganski, R.; Fowler, A.; Cheley, S.; Bayley, H. und Toner, M. (2000): *Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells*. Nature Biotechnology 18: 163-167
- Eroglu, A.;** Bailey, S. E.; Toner, M. und Toth, T. L. (2009): *Successful Cryopreservation of Mouse Oocytes by Using Low Concentrations of Trehalose and Dimethylsulfoxide*. Biology of reproduction 80:70-78
- Fahy, G. M.** und Karow, A. M. Jr. (1977): *Ultrastructure-function correlative studies for cardiac cryopreservation. V. Absence of a correlation between electrolyte toxicity and cryoinjury in the slowly-frozen, cryoprotected rat heart*. Cryobiology 14:418-427
- Fahy, G. M.** (1980): *Analysis of "solution effects" injury: rabbit renal cortex frozen in the presence of dimethyl sulfoxide*. Cryobiology 17: 371-388
- Fahy, G. M.** (1986): *The Relevance of Cryoprotectant "Toxicity" to Cryobiology*. Cryobiology 23:1-13

- Fan, W.;** Ma, X.; Liu, T. und Cui, Z. (2008): *Vitrification of Corneal Endothelial Cells in a Monolayer*. Journal of Bioscience and Bioengineering 106(6):610-613
- Fan, W.;** Ma, X.; Ge, D.; Liu, T. und Cui, Z. (2009): *Cryoprotectants for the vitrification of corneal endothelial cells*. Cryobiology 58:28-36
- Fishbein, W. N.** und Winkert, J. W. (1979): *Parameters of freezing damage to enzymes*. Proteins at Low Temperatures, Chapter 4, p. 55-82
- Fujita, T.;** Takami, Y.; Ezoe, K.; Saito, T.; Sato, K.; Takeda, N.; Yamamoto, Y.; Homma, K.; Jimbow, K. und Sato, N. (2000): *Successful Preservation of Human Skin by Vitrification*. J Burn Care Rehabil 21:304-9
- Gerlach, G.;** Dötzel, W.; Mehner, J. und Nguyen, N. (2006): *Einführung in die Mikrosystemtechnik – Ein Kursbuch für Studierende*. Carl Hanser Verlag
- Goffer, I.** (2005): *Morphologische Untersuchungen an retinellen Ganglienzellveränderungen in einem tierischen Glaukommodell*. Inaugural-Dissertation eingereicht an der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
- Götze, D.** (2011): *Untersuchung des Einflusses verschiedener Organkulturmedien auf die Überlebensfähigkeit des Endothels von Augenhornhäuten (Cornea)*. Diplomarbeit eingereicht an der TU Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
- Grehn, F.** (2008): *Augenheilkunde*. Springer Verlag, 30. Auflage
- Hagenah, M** und Böhnke, M. (1993): *Corneal Cryopreservation with Chondroitin Sulfat*. Cryobiology 30:396-406
- Hagenah, M.;** Böhnke, M. und Draeger, J. (1989): *Die Organkultur als Vitalitätstest für kryokonservierte Hornhäute*. Spektr Augenheild 3:99-102
- Halberstadt, M.;** Böhnke, M. und Hagenah, M. (1999): *Gefrierkonservierung von Kaninchenhornhäuten mit Trehalose*. 97. Jahrestagung der DOG 1999, P. 59
- Halberstadt, M.;** Athmann, S. und Hagenah, M. (2001): *Corneal Cryopreservation with Dextran*. Cryobiology 43:71-80
- Härle, F.** (1989): *Atlas der präprothetischen Operationen*. . Carl® Hanser Verlag
- Kahn, R. A.** (1978): *Biochemical changes in frozen platelets*. The Blood Platelet in Transfusion Therapy, 28:167-180
- Kanani, N.** (2009): *Galvanotechnik – Grundlagen, Verfahren, Technik*. Carl® Hanser Verlag, 2. Auflage
- Kang, X.** und Shen, H. (2012): *Pigmentation of Skin Graft Is Improved by Cryopreservation of Human Skin With Trehalose*. J Oral Maxillofac Surg 70:1464-1472
- Katenz, E.;** Vondran, F. W. R.; Schwartlander, R.; Pless, G.; Gong, X.; Chemng, X.; Neuhaus, P. und Sauer, I. M. (2007): *Cryopreservation of primary human hepatocytes: The benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent*. Liver Transpl 13:38-45
- Kiely, P. M.;** Smith, G. und Carney, L. G. (1982): *The mean shape of the human cornea*. Optica Acta, 29(8):1027-1040
- Kim, S. I.;** Choi, H. K.; Son, J. S.; Yun, J. H.; Jang, M. S.; Kim, H. R.; Song, J. Y.; Kim, J. H.; Choi, H. J. und Hong, S. S. (2001): *Cryopreservation of Taxus chinensis suspension cell cultures*. Cryo Letters 22(1):43-50

- Kim, H.;** Tanaka, S.; Une, S.; Nakaichi, M.; Sumida, S. und Taura, Y. (2004): *A comparative study of the effects of glycerol and hydroxyethyl starch in canine red blood cell cryopreservation*. J Vet Med Sci 66(12):1543-1547
- Kobayashi, S.;** Takei, M.; Kano, M.; Tomita, M. und Leibo, S. P. (1998): *Piglets produced by transfer of vitrified porcine embryos after stepwise dilution of cryoprotectants*. Cryobiology 36:20-31
- Komai, Y.** und Ushikif, T. (1991): *The Three-Dimensional Organization of Collagen Fibrils in the Human Cornea and Sclera*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 32(8)
- Körber, C.** und Scheiwe, M. W. (1980): *The cryoprotective properties of hydroxyethylstarch investigated by means of differential thermal analysis*. Cryobiology 17(1):54-65
- Kreder, H. J.;** Keeley, F. W. und Salter, R. (1993): *Cryopreservation of periosteum for transplantation*. Cryobiology 30:107-115
- Küstner, M.;** Klug, T. und Clemens, S. (2005): *Einfluss des Transportes auf organkultivierte Hornhäute – Experimentelle Studie über die Schädigung des Schweinehornhautendothels*. Ophthalmologie 102:708-714
- Langer, R.** und Vacanti, J. P. (1993): *Tissue engineering*. Science 260:920-926
- Laschet, M.** (2002): *Rheo-mechanische und rheo-optische Charakterisierung wässriger Lösungen von Hydroxyethylcellulosen und deren hydrophob modifizierter Derivate im Hinblick auf supramolekulare Strukturen*. Dissertation eingereicht im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg
- Latscha, H. P.** und Klein, H. A. (2002): *Anorganische Chemie – Chemie-Basiswissen I*. Springer-Verlag, 8. Auflage
- Lauer, G.** und Schimming R. (2002): *Klinische Anwendung von im Tissue Engineering gewonnenen autologen Mundschleimhauttransplantaten*. Mund Kiefer GesichtsChir 6:379-393
- Lehr, R.;** Hagenah, M. und Böhnke, M. (1992): *Gefrierkonservierung von Schweinehornhäuten mit Kombinationen von intra- und extrazellulären Kryoprotektoren*. Ophthalmol 89:519-523
- Leibo, S. P.** und Oda, K. (1993): *High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone*. Cryo-Letters 14:133-144
- Limaye, L.S.** und Kale, V. P. (2001): *Cryopreservation of human hematopoietic cells with membrane stabilizers and bioantioxidants as additives in the conventional freezing medium*. J Hematother Stem Cell Res 10(5):709-18
- Lionetti, F. J.;** Hunt, S. M.; Gore, J.M. und Curby, W. A. (1975): *Cryopreservation of human granulocytes*. Cryobiology 12(3):181-191
- Lionetti, F. J.;** Hunt, S. M.; Mattaliano, R. J. und Valeri, C. R. (1978): *In vitro studies of cryopreserved baboon granulocytes*. Transfusion 18(6):685-692
- Lovelock, J. E.** und Bishop, M. W. H. (1959): *Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide*. Nature 183:1394-1395
- Luo, K.;** Wu, G.; Wang, Q.; Sun, Y. und Liu, H. (1994): *Effect of dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch in the preservation of fractionated human marrow cells*. Cryobiology 31(4):349-354
- Luyckx, J.** und Baudouin, C. (2011): *Trehalose: an intriguing disaccharide with potential for medical application in ophthalmology*. Clinical Ophthalmology 5:577-581
- Lüllmann-Rauch, R.** (2009): *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, 3. Auflage



- Mabrut, J. Y.;** Adham, M.; Bourgeot, J. P.; Eljaafari, A.; DelaRoche, E. und Ducerf, C. (2001): *Mechanical and histological characteristics of human trachea before and after cryopreservation: an opportunity for tracheal tissue banking*. Transplant Proc 33(1–2):609-611
- Madden, P. W.** (1988): *The assessment of endothelial integrity by scanning electron microscopy and fluorescein diacetate staining following treatment with cryoprotective additives*. Current Eye Research 8(1):17-36
- Madden, P. W.;** Taylor, M. J.; Hunt, C. J. und Pegg, D. E. (1993): *The effect of Polyvinylpyrrolidone and the cooling rate during corneal cryopreservation*. Cryobiology 30:135-157
- Mantovani, R.;** Rota, A.; Falomo, M. E.; Bailoni, L. und Vincenti, L. (2002): *Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with the hypoosmotic swelling test*. Reprod. Nutr. Dev 42(3):217-226
- Mazur, P.** (1977): *The Role of Intracellular Freezing in the Death of Cells Cooled at Supraoptimal Rates*. Cryobiology 14:251-272
- Mazur, P.** (1984): *Freezing of living cells: mechanisms and implications*. Am J Physiol. 247(3):C125-C142
- Merten, O. W.;** Petres, S. und Couve, E. (1995): *A simple serum-free freezing medium for serum-free cultured cells*. Biologicals 23:185-189
- Meryman, H. T.** (1966): *The relationship between dehydration and freezing injury in the human erythrocyte*. Cellular Injury and Resistance in Freezing Organisms 2:231-244
- Michels, H.** und Neumann, C. L. (2007): *Kurzlehrbuch Anatomie*. Urban & Fischer Verlag
- Michler, G. H.** und Lebek, W. (2004): *Ultramikrotomie in der Materialforschung*. Carl® Hanser Verlag
- Misholi, A.** (2010): <http://www.techniklexikon.net/d/rasterelektronenmikroskop/rasterelektronenmikroskop.htm>, Zugriff: 18/06/2012
- Mitchell, D.L.;** Synnott, S.A. und VanDercreek, J.A. (1990): *Tissue reaction involving an intraoral skin graft and CP titanium abutments: a clinical report*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants 5: 79-84
- Moharamzadeh, K.;** Brook, I. M.; Van Noort, R.; Scutt, A. M. und Thornhill, M.H. (2007): *Tissue-engineered Oral Mucosa: a Review of the Scientific Literature*. J Dent Res 86(2):115-124
- Moharamzadeh, K.;** Colley, H.; Murdoch, C.; Hearnden, V.; Chai, W. L.; Brook, I. M.; Thornhill, M.H. und MacNeil, S. (2012): *Tissue-engineered Oral Mucosa*. J Dent Res 91(7):642-650
- Moll, K.** und Moll, M. (2006): *Anatomie*. Urban & Fischer, 18 Auflage
- Muldrew, K.;** Novak, K.; Studhome, C.; Wohl, G.; Zernicke, R. und Schachar, N. S. (2001): *Transplantation of articular cartilage following a step-cooling cryopreservation protocol*. Cryobiology 43:260-267
- Mulisch, M.** und Welsch, U. (2010): *Romeis- Mikroskopische Technik*. Spektrum Akademischer Verlag, 18. Auflage
- Müller, M.** (2005): *Experimentelle Untersuchungen zur Pharmakokinetik lokal applizierten Thalidomids am Auge*. Dissertation eingereicht an der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

- Müller, J.** (2012): *Entwicklung von Kryokonservierungsmedien ohne zytotoxische kryoprotektive Zusätze*. Bachelorarbeit eingereicht an der Technische Universität Dresden, Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften, Fachrichtung Biologie
- Naaldjik, Y.**; Staude, M.; Federova, V. und Stolzing, A. (2012): *Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide*. BMC Biotechnology 12:49
- Neronov, A.**; Mazgalova, J.; Cholakova, M.; Dimitrova, M.; Deligiozova, I.; Kovatcheva, S. und Nikolova, E. (2005): *Integrity of endothelium in cryopreserved human cornea*. CryoLetters 26(2):131-136
- Neveux, N.**; De Bandt, J. P.; Charrueau, C.; Savier, E.; Chaumeil, J. C. und Hannoun, L. (1997): *Deletion of hydroxyethylstarch from University of Wisconsin solution induces cell shrinkage and proteolysis during and after cold storage of rat liver*. Hepatology 25(3):678-682
- Nishida, T.** (1997): *Chapter 1*. In: Krachmer, J. H., Mannis, M. J., Holland, E. J., Cornea - Fundamentals of Corneal and External Disease. St. Louis Mosby 5
- Ohno, T.**; Kurita, K.; Shin-ichiro, A.; Eimori, N. und Ikawa, Y. (1988): *A simple freezing medium for serum-free cultured cells*. Cytotechnology 1:257-260
- O'Neill, P.**; Mueller, F. O. und Trevor-Roper, P. D. (1967): *On the preservation of corneae at -196°C for full-thickness homografts in man and dog*. Br J Ophthalmology 51:13-30
- Özkavukcu, S.** und Erdemli, E. (2002): *Cryopreservation: Basic knowledge and biophysical effects*. Journal of Ankara Medical School 24(4): 187-196
- Pasch, J.**; Schiefer, A.; Heschel, I. und Rau, G. (1999): *Cryopreservation of Keratinocytes in a Monolayer*. Cryobiology 39:158-168
- Pascual, G.**; Rodriguez, M.; Corrales, C.; Turégano, F.; Garcia-Honduvilla, N. und Bellon, J. M. (2004): *New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes*. Cryobiology 48:62-71
- Pegg, D.**; Wusteman, M. und Boylan, S. (1997): *Fractures in cryopreserved elastic arteries*. Cryobiology 34:183-192
- Pegg, D. E.** (2007): *Principles of cryopreservation*. Methods Mol Biol. 368:39-57
- Phillips, J. J.**; Bramwell, R. K. und Graham, J. K. (1996): *Cryopreservation of Rooster Sperm Using Methyl Cellulose*. Poult. Sci. 75(7):915-923
- Piersol, G. A.** (1908): *Human Anatomy. II:1450*
- Poitout, D. G.** (1996): *Avenir des allogreffes osseuses dans les résections osseuses massives pour tumeur*. Presse Medicale 25:527-530
- Potrykus, K.** und Suhr, T. (2011): *Osmotisches Verhalten von Zellen*. frozen life news Ausgabe extra 6 Mai
- Promega Corporation** (2009): *Technical Bulletin: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay*. Part# TB245, printed in USA, revised 6/09
- Rich, S.J.** und Armitage, W. J. (1990): *Propane-1,2-diol as a Potential Component of a Vitrification Solution for Corneas*. Cryobiology 27:42-54

- Rich, S.J.** und Armitage, W. J. (1991): *Corneal Tolerance of Vitrifiable Concentrations of Propane-1,2-diol*. Cryobiology 28:159-170
- Rich, S.J.** und Armitage, W. J. (1991): *The Potential of an Equimolar Combination of Propane-1,2-Diol and Glycerol as a Vitrification Solution for Corneas*. Cryobiology 28:314-326
- Richter, G.** (2003): *Praktische Biochemie – Grundlagen und Techniken*. Georg Thieme Verlag
- Rodrigues, J. P.**; Paraguassù-Braga, F. H.; Carvalho, L.; Abdelhay, E.; Bouzas, L. F. und Porto, L. C. (2008): *Evaluation of trehalose and sucrose as cryoprotectants for hematopoietic stem cells of umbilical cord blood*. Cryobiology 56:144-151
- Rohen, J. W.** (1996): *Funktionelle Anatomie der Kornea, Episklera und Konjunktiva. Das äussere Auge: Hauptreferate der XXXI. Essener Fortbildung für Augenärzte*. Enke-Verlag
- Routledge, C.** und Armitage, W. J. (2003): *Cryopreservation of cornea: a low cooling rate improves functional survival of endothelium after freezing and thawing*. Cryobiology 46:277-283
- Roux, W.** (1885): *Beiträge zur Entwicklungsmechanik des Embryo*. Z Biol 21:411
- Rudolph, A. S.** und Crowe J. H. (1985): *Membrane Stabilization during Freezing: The Role of Two Natural Cryoprotectants, Trehalose and Proline*. Cryobiology 22:367-377
- Saha, S.**; Otoi, T.; Takagi, M.; Boediono, A.; Sumantri, C. und Suzuki, T. (1996): *Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone*. Cryobiology 33:291-299
- Salehnia, M.** (2002): *Autograft of Vitrified Mouse Ovaries Using Ethylene Glycol as Cryoprotectant*. Experimental Animals 51(5):509-512
- Sammarco, V. J.**; Gorab, R.; Miller, R. und Brooks, P. J. (1997): *Human articular cartilage storage in cell culture medium: guidelines for storage of fresh osteochondral allografts*. Orthopedics 20:497-500
- Sauerbier, S.**; Gutwald, R.; Wiedmann-Al-Ahmad, M.; Lauer, G. und Schmelzeisen, R. (2006): *Clinical application of tissue-engineered transplants. Part I: mucosa*. Clin. Oral Impl. Res. 17:625-632
- Schill, R. O.** (2010): *Von Biodiversität bis Biotechnologie: Bärtierchen und die Kunst des Überlebens*. Biologie in unserer Zeit 40(4):254-259
- Schiller, A.** (1998): *Topographische und angewandte Anatomie des Auges und Ohres der Katze unter besonderer Berücksichtigung moderner bildgebender Verfahren (CT und MRT)*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
- Schmalz, M.** (2009): *Optimierung der Kalt-Lagerungskonservierung für Cornea-Transplantate am Schweineauge*. Dissertation eingereicht im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Schwenzer, N.** und Ehrenfeld M. (2000): *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde: Zahnärztliche Chirurgie Band 3*. Georg Thieme Verlag, 3. Auflage
- Schuchardt, K.** (1952): *Application of epidermis transplantation in vestibuloplasty*. Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift 7:364-369
- Schultz, R. O.**; Matsuda, M.; Yee, R. W.; Glasser, D. B.; Sabin, S. M. und Edelhauser, H. F. (1985): *Long-term survival of cryopreserved corneal endothelium*. Ophthalmology 92:1663-1667

- Seeber, J. W.** (2008): *Entwicklung und Charakterisierung eines humanen Cornealen Epithel-Modells auf der Basis einer SV40-immortalisierten Zelllinie zur Bestimmung der okularen Toxizität*. Dissertation eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie an der Freien Universität Berlin
- Silvestre, M. A.**; Saeed, A. M.; Cervera, R. P.; Escribá, M. J. und García-Ximénez, F. (2003): *Rabbit and pig ears skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death*. *Theriogenology* 59(5–6):1469-1477
- Skoog, D. A.** und Leary, J. J. (1996): *Instrumentelle Analytik: Grundlagen – Geräte – Anwendungen*. Springer-Verlag
- Songsasen, N.**; Buckrell, B. C.; Plante, C. und Leibo, S. P. (1995): *In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos*. *Cryobiology* 32(1):78-91
- Spoerl, G.**; Mai, R.; Klingner, E.; Gedrange, T. und Lauer, G. (2008): *Cryopreserved tissue engineered mucosa*. *Folia Histochem Cytobiol.* 46(4):541-544
- Smillie, J. A.**; Munro, A. C.; Wood, G. C. und Mitchell, R. (1981): *Cryopreservation of human platelets with polyvinylpyrrolidone*. *Transfusion* 21(5):552–556
- Standfast, N. F.** und Jorgensen, W. K. (1997): *Comparison of the infectivity of Babesia bovis, Babesia bigemina and Anaplasma centrale for cattle after cryopreservation in either dimethylsulphoxide (DMSO) or polyvinylpyrrolidone (PVP)*. *Australian Veterinary Journal* 75(1):62–63
- Stolzing, A.**; Naaldijk, Y.; Fedorova, V. und Sethe S. (2012): *Hydroxyethylstarch in cryopreservation – Mechanisms, benefits and problems*. *Transfusion and Apheresis Science* 46:137–147
- Sudo, K.**; Asoh, S.; Ohsawa, I.; Ozaki, D.; Yamagata, K.; Ito, H. und Otha, S. (2005): *The anticell death FNK protein protects cells from death induced by freezing and thawing*. *Biochem Biophys Res Commun* 330(3):850-856
- Takahashi, T.**; Hirsh, A.; Erbe, E. und Williams, R. J. (1988): *Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes*. *Biophys J* 54(3):509-518
- Tallgren, A.** (1972): *The continuing reduction of the residual alveolar ridge in complete denture wearers: a mixed longitudinal study covering 25 years*. *J Prosthet Dent* 27:120-132
- Taylor, M. J.** und Hunt, C. J. (1985): *A new preservation solution for storage at low temperature*. *Curr. Eye Res.* 4:965-973
- Taylor, M. J.** (1986): *Clinical Cryobiology of Tissues: Preservation of Corneas*. *Cryobiology* 23:323-353
- Teramoto, N.**; Sachinvala, N. D. und Shibata, M. (2008): *Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials*. *Molecules* 13:1773-1816
- Tijssen, M. R.**; Woelers, H.; Vries-van Rossen, A.; van der Schoot, C. E.; Voermans, C. und Lagerberg J. W. (2008): *Improved postthaw viability and in vitro functionality of peripheral blood hematopoietic progenitor cells after cryopreservation with a theoretically optimized freezing curve*. *Transfusion* 21
- Toyosawa, T.**; Sasaki, M.; Kato, Y.; Yamada, H. und Terada, S. (2007): *Development of A Novel Serum-free Cryopreservative Solution*. *Cell Technology for Cell Products*, Chapter 3, pp. 225-231
- Umemura, E.**; Yamada, Y.; Nakamura, S.; Ito, K.; Hara, K. und Ueda, M. (2011): *Viable Cryopreserving Tissue-Engineered Cell-Biomaterial for Cell Banking Therapy in an Effective Cryoprotectant*. *Tissue Engineering, Part C*, 17(8):799-807

- Van Horn, D. L.** und Schultz, R. O. (1974): *Endothelial survival in cryopreserved human corneas: a scanning electron microscope study*. Invest Ophthalmol Vis Sci 13:7-16
- Villalba, R.;** Benitez, J.; de No-Lowis, E. und Rioja, L. F. (1995): *The effect of amphotericin B on the viability of cryopreserved human skin*. Cryobiology 32:314-317
- Villalba, R.;** Benitez, J.; de No-Lowis, E. D.; Rioja, L. F. und Gomez-Villagran, J. L. (1996): *Cryopreservation of human skin with propane-1,2-diol*. Cryobiology 33:525-529
- Waring, G.O. 3<sup>rd</sup>;** Bourne, W. M.; Edelhauser, H. F. und Kenyon, K. R. (1982): *The corneal endothelium: normal and pathologic structure and function*. Ophthalmology 89(6):531-590
- Welsch, U.** (2006): *Lehrbuch der Histologie*. Urban & Fischer Verlag, 2.Auflage
- Wolkers, W. F.;** Walker, N. J.; Tablin, F. und Crowe, J. H. (2001): *Human Platelets Loaded with Trehalose Survive Freeze-Drying*. Cryobiology 42(2):79-87
- Wusteman, M. C.;** Boylan, S. und Pegg, D. E. (1997): *Cryopreservation of Rabbit Corneas in Dimethyl Sulfoxide*. Investigative Ophthalmology & Visual Science 38(10):1934-1943
- Wusteman, M. C.;** Armitage, W. J.; Wang, L.; Busza, A. L. und Pegg, D. E. (1999): *Cryopreservation studies with porcine corneas*. Current Eye Research 19(3):228-233
- Wusteman, M. C.;** Simmonds, J.; Vaughan, D. und Pegg, D. E. (2007): *Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose*. Cryobiology 56:62-71
- Yeh, H. J.;** Yao, C. L.; Chen, H. I.; Cheng, H. C. und Hwang, S. M. (2008): *Cryopreservation of human limbal stem cells ex vivo expanded on amniotic membrane*. Cornea 27:327-333
- Younis, A.;** Carnovale, D.; Butler, W. und Eroglu, A. (2009): *Application of intra- and extracellular sugars and dimethylsulfoxide to human oocyte cryopreservation*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 26(6):341-345
- Zhang, X. B.;** Li, K.; Yau, K. H.; Tsang, K. S.; Fok, T. F.; Li, C. K.; Lee, S. M. und Yuen, P. M. (2003): *Trehalose ameliorates the cryopreservation of cord blood in a preclinical system and increases the recovery of CFU's, long-term culture initiating cells, and nonobese diabetic-SCID repopulating cells*. Transfusion 43:265-272
- Zieger, M. A. J.;** Tredget, E. E. und McGann, L. E. (1996): *Mechanisms of cryoinjury and cryoprotection in split-thickness skin*. Cryobiology 33:376-89
- Zieger, M. A. J.;** Tredget, E. E.; Sykes, B. D. und McGann L. E. (1997): *Injury and protection in split-thickness skin after very rapid cooling and warming*. Cryobiology 35:53-69

# **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 30.08.2012

---

**Ort, Datum**

---

**Unterschrift**